

**Der ABC-Importer MalF1G1K1<sub>2</sub>-E1 aus *Lactobacillus casei* BL23 -  
Biochemische Charakterisierung und Einblicke in die Regulation  
durch P-Ser46-HPr**

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r   r e r u m   n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

von

**Diplom-Biologin Constanze Homburg**

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter:    1. Prof. Dr. Thomas Eitinger  
                  2. Prof. a.D. Dr. Erwin Schneider  
                  3. Prof. Dr. Josef Deutscher

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 2018



## Zusammenfassung

Katabolitrepession ist ein globaler regulatorischer Mechanismus, der es Prokaryoten ermöglicht, die Verwertung von Kohlenhydraten zu kontrollieren. Als Teil dieses Netzwerks inhibieren Komponenten des Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferasesystems die Aufnahme von weniger bevorzugten Zuckern in Anwesenheit primärer Kohlenstoffquellen wie Glucose. Dieser als Induktorausschluss bezeichnete Prozess wird in Bakterien des Phylums Firmicutes durch das am Serin46 phosphorylierte HPr (P-Ser46-HPr) vermittelt. Der genaue Mechanismus ist jedoch unklar. Um diese Frage auf der Grundlage von isolierten Proteinen zu klären, wurde ein zum *Escherichia coli* Maltose-/Maltodextrin-ABC-Transporter homologes System aus *Lactobacillus casei* BL23 (MalE1-MalF1G1K1<sub>2</sub>) als Modellsystem genutzt.

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde über isothermale Titrationskalorimetrie und Fluoreszenzspektroskopie gezeigt, dass das Bindeprotein MalE1 lineare und zyklische Maltodextrine, aber keine Maltose bindet. Experimentell ermittelte dreidimensionale Strukturen von MalE1 im Komplex mit diesen Zuckern, belegen eine vergleichbar geschlossene Konformation sowohl um die linearen als auch zyklischen Substrate. Sie dienen zusätzlich als Grundlage, um die fehlende Maltosebindung zu erklären. Die Stimulierung der ATPaseaktivität des in Liposomen und Nanodiscs eingebauten MalF1G1K1<sub>2</sub>-Komplexes wurde jedoch hauptsächlich durch eine MalE1-Beladung mit linearen Maltodextrinen bewirkt, während der Import von  $\beta$ -Cyclodextrin nur bei sehr hohen Konzentrationen möglich scheint. Eine bis zu 85 %ige Inhibierung der ATPaseaktivität durch P-Ser46-HPr belegte erstmals *in vitro* eine Interaktion von mehr als einem phosphorylierten Protein mit dem Transporter. Analog zum EIIA<sup>Glc</sup>-Inhibitor des homologen Systems aus *E. coli* wurden über Quervernetzungsexperimente und massenspektrometrische Analysen Interaktionen mit dem MalK1-Dimer als interagierende Komplexeinheit in der Nähe des Walker A-Motivs nachgewiesen. Über Fluoreszenzmessungen in Anwesenheit des ATP-Analogons TNP-ATP wurde jedoch eine unbeeinflusste ATP-Bindung und damit eine fehlende Blockade der  $\gamma$ -Phosphatbindestelle des Walker-A Motivs durch die Phosphorylgruppe von P-Ser46-HPr bestimmt. Die folgende Substitution verschiedener positiv geladener MalK1-Reste, die als potenzielle Interaktionsstellen für die Phosphorylgruppe fungieren könnten, identifizierte K63 in der Nähe des Walker A-Motivs als ersten möglichen Partner. Der genaue Mechanismus der Inhibierung bleibt jedoch unklar.

## Summary

Catabolite repression is a global mechanism which controls the utilization of carbohydrates in bacteria. In the phylum Firmicutes HPr, a component of the phosphoenolpyruvate carbohydrate phosphotransferase system, prevents the uptake of less preferred sugars but only when it is phosphorylated at serine46. However the exact mechanism was unclear. To address this question the purified ATP-binding cassette transporter from *Lactobacillus casei* BL23 (MalE1-MalF1G1K12) was used as a model system, which is homologous to the *Escherichia coli* maltose/maltodextrin ABC importer.

Isothermal titration calorimetry and fluorescence spectroscopy revealed that the binding protein MalE1 binds linear and cyclic maltodextrins but not maltose. Experimentally determined three-dimensional structures from MalE1 in complex with these sugars show a comparably closed conformation around both the linear and cyclic substrates. They also served as a basis to explain the lack of maltose binding. The stimulation of the ATPase activity of the transporter incorporated in liposomes and nanodiscs however, was mainly caused by MalE1 loaded with linear maltodextrins, while the import of  $\beta$ -Cyclodextrin seems possible only at very high concentrations. For the first time an inhibition of ATPase activity by P-Ser46-HPr up to 85 % and an interaction of more than one phosphorylated protein with the transporter was demonstrated. Analogous to the EIIAGlc inhibitor of the homologous system from *E. coli*, cross-linking experiments and mass spectrometric analyzes revealed interactions with the MalK1 dimer near the Walker A motif. Fluorescence measurements in the presence of the ATP analogue TNP-ATP, however, revealed an unaffected ATP binding and thus a lack of blockade of the  $\gamma$ -phosphate binding site (Walker A motif) by the phosphoryl group from P-Ser46-HPr. The following substitution of several positively charged MalK1 residues that could act as potential sites of interaction for the phosphoryl group, identified K63 near the Walker A motif as the first potential partner. The exact mechanism of inhibition, however, remains unclear.



## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>I</b>
<b>Summary .....</b>	<b>II</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 ABC-Transportsysteme.....	1
1.1.1 Geschichte und medizinische Relevanz .....	1
1.1.2 Klassifizierung und grundlegender Aufbau .....	2
1.1.3 Strukturelle Details der SBPs, TMDs und NBDs.....	3
1.1.4 Der katalytische Zyklus von ABC-Importern .....	8
1.1.5 Entdeckung eines ABC-Importsystems aus <i>L. casei</i> BL23.....	11
1.2 Regulation des Kohlenstoffmetabolismus.....	13
1.2.1 Katabolitrepression in Enterobacteriaceae .....	15
1.2.2 Katabolitrepression in Firmicutes .....	17
1.3 Zielstellung der Arbeit .....	20
<b>2 Ergebnisse .....</b>	<b>21</b>
2.1 Charakterisierung des Bindeproteins MalE1.....	21
2.1.1 Isolation von MalE1 aus <i>E. coli</i> .....	21
2.1.2 Substratbindungstests über isothermale Titrationskalorimetrie .....	21
2.1.3 Substratbindungstests über Fluoreszenzspektroskopie .....	23
2.1.4 Bindungstests mit radioaktiv markierten Substraten .....	25
2.1.5 Kristallisation von MalE1.....	26
2.2 Funktionelle Charakterisierung von MalE1-MalF1G1K1 <sub>2</sub> .....	30
2.2.1 Überproduktion und Reinigung von MalF1G1K1 <sub>2</sub> aus einem <i>E. coli</i> -Wirtsstamm30	
2.2.2 Funktionelle Rekonstitution und Nachweis der ATPaseaktivität.....	30
2.2.3 Veränderung der ATPaseaktivität in Anwesenheit nachgereinigter Maltose.....	32
2.2.4 Strukturmodell des Transporters.....	33
2.3 Regulation des Mal1-Systems über P-Ser46-HPr .....	34
2.3.1 Isolation und Phosphorylierung verschiedener HPr-Varianten .....	34
2.3.2 Einfluss verschiedener HPr-Varianten auf die ATPaseaktivität des Transporters35	
2.3.3 Identifizierung der mit P-Ser46-HPr interagierenden Einheit des Transporters .	37
2.3.4 Analyse der Kontaktstelle von P-Ser46-HPr innerhalb von MalK1 .....	41
2.3.5 Einfluss der P-Ser46-HPr-/MalK1-Interaktion auf die Nukleotidbindung .....	42
2.3.6 Versuche zur Eingrenzung der genauen Bindestelle in MalK1 .....	43
<b>3 Diskussion .....</b>	<b>51</b>

<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>62</b>
4.1	Molekularbiologische Methoden .....	62
4.1.1	Polymerasekettenreaktion.....	62
4.1.2	Ortsgerichtete Mutagenese .....	62
4.1.3	Oligonukleotide.....	62
4.1.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	63
4.1.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	64
4.1.6	Restriktion .....	64
4.1.7	Ligation.....	64
4.1.8	Transformation kompetenter Zellen.....	64
4.1.9	Isolierung von Plasmid-DNA.....	64
4.1.10	DNA-Sequenzierung .....	65
4.1.11	Plasmide und dessen Konstruktion.....	65
4.2	Zellbiologische Methoden .....	66
4.2.1	Bakterienstämme.....	66
4.2.2	Kulturmedien .....	67
4.2.3	Medienzusätze .....	67
4.2.4	Herstellung kompetenter Zellen .....	67
4.2.5	Kultivierung von Bakterienstämmen .....	68
4.2.6	Konservierung von Bakterienstämmen.....	68
4.3	Biochemische Methoden.....	68
4.3.1	Reinigung von MalE1.....	68
4.3.2	Reinigung von MalE2.....	69
4.3.3	Reinigung von MalF1G1K1 <sub>2</sub> .....	69
4.3.4	Reinigung von HPr .....	70
4.3.5	Reinigung der HPr Kinase .....	70
4.3.6	Umpuffern von Proteinlösungen .....	71
4.3.7	Proteinbestimmung .....	71
4.3.8	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	71
4.3.9	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	72
4.3.10	Western-Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen.....	72
4.3.11	HPr Phosphorylierung .....	73
4.3.12	Präparation von Proteoliposomen.....	73
4.3.13	Präparation von Nanodiscs .....	74

4.3.14	ATPase Assay nach Ames .....	75
4.3.15	Inhibierung der ATPaseaktivität durch P-Ser46-HPr .....	75
4.3.16	Inhibierung der ATPaseaktivität durch Orthovanadat .....	75
4.3.17	Thrombinverdau .....	75
4.3.18	Quervernetzungsversuche .....	76
4.3.19	Limitierter Trypsinverdau .....	77
4.3.20	Papierchromatographie .....	78
4.3.21	Substratbindungsassay mittels radioaktiv markierter Substrate .....	78
4.4	Biophysikalische Methoden .....	79
4.4.1	Kristallisation von MalE1 .....	79
4.4.2	Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) .....	79
4.4.3	Fluoreszenzspektroskopie .....	79
4.4.4	Massenspektrometrie .....	80
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>101</b>
	<b>Publikation .....</b>	<b>109</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>110</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>111</b>

# 1 Einleitung

Die biologische Zellmembran dient zum einen der Trennung und Anreicherung von Stoffen und zum anderen einem selektiven Stofftransport. Ein gezielter Transport von Substanzen in oder über Membranen findet zumeist nicht spontan statt, sondern benötigt Transportsysteme (für Details *Transporter Classification Database*, <http://tcdb.org/>; Saier *et al.*, 2014). Beim passiven Transport, zum Beispiel über Kanal- oder Carrierproteine, überwinden kleine Moleküle ohne Zufuhr von Energie die Membran. Bei einem aktiven Transport wird Energie aus einem elektrochemischen Gradienten (sekundär) oder aus der Hydrolyse energiereicher Verbindungen (primär), wie zum Beispiel Adenosintriphosphat (ATP) bei ABC (*ATP-binding cassette*)-Transportern, gewonnen. Gruppentranslokationssysteme wie die bakteriellen Phosphotransferasesysteme (PTS), bei denen das Substrat während des Transportprozesses chemisch modifiziert wird, stellen einen weiteren Transportmechanismus dar.

## 1.1 ABC-Transportsysteme

### 1.1.1 Geschichte und medizinische Relevanz

Der Grundstein für die Entdeckung der ABC-Transporter wurde durch detaillierte Studien zur Physiologie der Nährstoffaufnahme in Bakterien in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts gelegt. Zehn Jahre bevor die ABC-Superfamilie definiert wurde, waren die ersten identifizierten Komponenten eines ATP-abhängigen Importsystems, die im periplasmatischen Raum von Gram-negativen Bakterien löslichen Substratbindeproteine (PBPs) (Pardee, 1968; Kalckar, 1971; Berger & Heppel, 1974). Durch die Entdeckung vergleichbarer Transportsysteme mit an der Cytoplasmamembran verankerten Substratbindeproteinen in Gram-positiven Bakterien (Gilson *et al.*, 1988; Sutcliffe & Russell, 1995) wurde in den späten 1980er Jahren die Bezeichnung periplasmatische Bindeproteine (PBPs) durch die allgemeinere Bezeichnung Substratbindeproteine (SBPs) abgelöst. Die Identifizierung und Sequenzierung von prokaryotischen als auch eukaryotischen ATP-abhängigen Transportsystemen, einschließlich des humanen *permeability glycoproteins* (*P-gp*) (Higgins *et al.*, 1982; Riordan *et al.*, 1985), führte zur Prägung des Begriffs *ATP-binding cassette*-Transporter (Higgins *et al.*, 1986). Einige Jahre später wurden diese Transporter einer ABC-Superfamilie zugeordnet (Hyde *et al.*, 1990). Innerhalb der Studien wurde die Kopplung des Substrattransports mit der Hydrolyse von ATP über eine ATP-Bindekassette innerhalb der Membran beschrieben (Walker *et al.*, 1982; Mimmack *et al.*, 1989).

ABC-Transporter sind in den unidirektionalen Transport von Spurenelementen, Ionen, Mono- und Polysacchariden bis hin zu Vitaminen, Aminosäuren, Peptiden und Lipiden involviert. Das breite Substratspektrum spiegelt die vielseitigen Funktionen wider. Diese umfassen hauptsächlich bei Prokaryoten den Nährstoff- oder Vitaminimport in das Cytoplasma sowie den Export von Lipiden, Sterolen, Antibiotika, Pharmazeutika, Toxinen oder Pathogenitätsfaktoren in den extrazellulären Raum oder in intrazelluläre

Kompartimente (Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Peroxisomen). Besonderes Interesse gilt den ABC-Proteinen aufgrund ihrer weitgefächerten medizinischen Relevanz. Mutationen in den Genen der ABC-Transporter sind dabei der Grund oder Auslöser für zahlreiche humane Krankheiten (zur Übersicht, siehe Tarling *et al.*, 2013; Theodoulou & Kerr, 2015). Die Erbkrankheit Mukoviszidose resultiert, aufgrund von Mutationen im CFTR-*Cystis Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*-Gen, aus einer Fehlfunktion eines membranständigen cAMP-regulierten Chloridkanals und führt zu einem gestörten Chlorid-, Natrium- und Wasserhaushalt aller exokriner Drüsen des Menschen (Veit *et al.*, 2016). Andererseits kann die Überproduktion von ABC-Exportern, beispielsweise des MDR-*multidrug resistance proteins*- (Gottesman & Pastan, 1993; Callaghan, 2015) oder des BCRP-*breast cancer resistance proteins*- (Doyle *et al.*, 1998), in multiresistenten Krebszellen zu einem Export verschiedener Klassen an Zytostatika führen und damit zur Ausbildung von Chemoresistenzen gegenüber verschiedener Medikamente (Kathawala *et al.*, 2015).

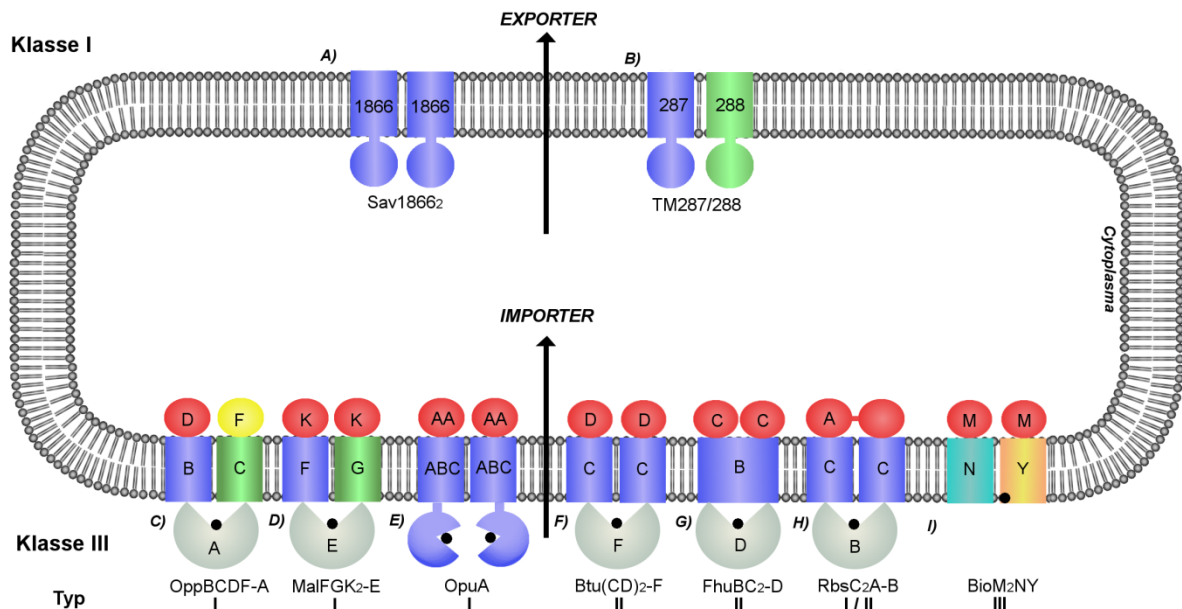
### 1.1.2 Klassifizierung und grundlegender Aufbau

Die Superfamilie der ABC-Transporter ist eine der größten Klassen von Membranproteinen und in allen Domänen des Lebens vertreten (Dassa & Bouige, 2001; Theodoulou & Kerr, 2015). Eukaryotische ABC-Transporter werden in sieben Subfamilien unterteilt (Xiong *et al.*, 2015). Dabei sind im menschlichen Genom 49 ABC-Transporter (Vasiliou *et al.*, 2009) und in pflanzlichen Genomen häufig über 100 verschiedene ABC-Transportsysteme (Kang *et al.*, 2011) bekannt. Im Gegensatz dazu wurden in *E. coli* K12 bislang 65 ABC-Transporter (Moussatova *et al.*, 2008) und damit in Prokaryoten die größte Anzahl an ABC-Transportern in Bezug auf die Genomgröße identifiziert (Davidson *et al.*, 2008).

Basierend auf der Phylogenie, Funktion und allgemeinen Architektur werden ABC-Transportsysteme in drei Klassen unterteilt (Dassa, 2011). Die größte Klasse I bilden die ABC-Exporte, welche sowohl bei Pro- als auch Eukaryoten vorkommen (Abbildung 1). Klasse II umfasst nichttransportierende ABC-Proteine die intrazellulär unter anderem an Prozessen der DNA-Reparatur beteiligt sind (Paull & Deshpande, 2014). Die Klasse III bilden ABC-Importe, welche auf ein hochaffines SBP angewiesen sind und fast ausschließlich in Prokaryoten vorkommen (Eitinger *et al.*, 2011). Als weitere Unterteilung dieser Klasse umfassen die Typen I und II kanonische Importe mit unterschiedlicher Membrantopologie (Übersicht in ter Beek *et al.*, 2014), während Typ III die erst seit wenigen Jahren bekannten *Energy-Coupling Factor* (ECF)-Importe beinhaltet. Diese weisen aufgrund eines membranintegralen SBP's strukturelle und mechanistische Unterschiede auf (Rodionov *et al.*, 2009; Rice *et al.*, 2014) (Abbildung 1).

Trotz der großen Komplexität in Funktion und Substratspezifität weisen ABC-Transporter einen einheitlichen Kern aus zwei Transmembrandomänen (TMDs) und zwei Nukleotidbindedomänen (NBDs) auf (Davidson *et al.*, 2008). In Prokaryoten sind die vier Domänen aus separaten, identischen oder unterschiedlichen Proteinen aufgebaut (Holland & Blight, 1999) und in ihrer Architektur divers. Typischerweise sind homo- oder

heterodimere TMDs an homodimere NBDs gebunden. Bei prokaryotischen Exportern wie Sav1866<sub>2</sub> aus *Staphylococcus aureus* (Dawson & Locher, 2006) und TM287/TM288 aus *Thermotoga maritima* (Hohl *et al.*, 2012) sind Fusionen der TMDs mit den NBDs nicht selten (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Klassifikation von ABC-Transportsystemen.** Die Darstellung beschränkt sich auf prokaryotische Klasse I Exporter und Klasse III Importer. Der homodimere *half-size* Transporter Sav1866<sub>2</sub> aus *S. aureus* (A) und der heterodimere *half-size* Transporter TM287/288 aus *T. maritima* (B) sind Beispiele der Klasse I Exportsysteme. Klasse III Importsysteme umfassen u.a. den Oligopeptidtransporter OppBCDF-A (C), Maltose-/Maltodextrintransporter MalFGK<sub>2</sub>-E (D), Glycin-Betaintransporter OpuA aus *Lactococcus lactis* (E), der durch die Fusion des Bindeproteins mit den TMDs über zwei Substratbindedomänen verfügt, Vitamin B<sub>12</sub>-Transporter Btu(CD)<sub>2</sub>-F (F), Fe<sup>3+</sup>-Hydroxamattransporter FhuBC<sub>2</sub>-D (G), Ribosetransporter RbsC<sub>2</sub>A-B (H) und den BioM<sub>2</sub>NY ECF-Transporter aus *Rhodobacter capsulatus* (I) ohne ein extracytoplasmatisches Bindeprotein. Die Transporter C, D, F, G und H stammen aus *E. coli*. Die Lipiddoppelschicht wurde schematisch dargestellt.

Prokaryotische ECF-Importsysteme stellen aufgrund ihrer nichthomologen TMDs und dem Fehlen eines extracytoplasmatischen SBP's eine Ausnahme dar. Sie setzen sich aus NBDs (A-Komponenten), einer TMD (T-Komponente) und einem integralen Membranprotein zusammen, das Substrat binden kann (S-Komponente) (Rodionov *et al.*, 2009; Eitinger *et al.*, 2011; Abbildung 1). Diese Transporterklasse importiert hauptsächlich Spurenelemente wie Vitamine (Biotin, Thiamin, Riboflavin) und Übergangsmetalle (Nickel, Cobalt). Neben den vier Domänen benötigen kanonische ABC-Importsysteme (Typ I und II) SBPs, die für die hochaffine Bindung von löslichen Substraten und die Übermittlung dieser an die TMDs verantwortlich sind (Berntsson *et al.*, 2010).

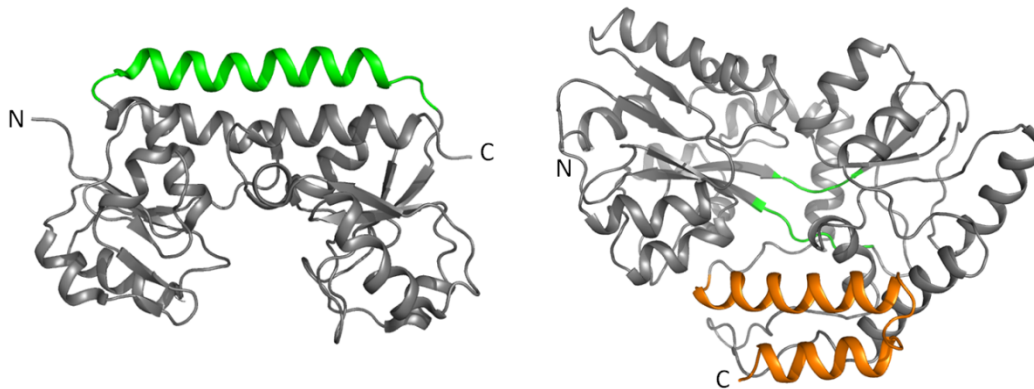
### 1.1.3 Strukturelle Details der SBPs, TMDs und NBDs

**Substratbindeproteine (SBPs)** binden hochaffin (Dissoziationskonstanten von 0,01 bis 10 µM) eine Vielzahl an Substraten (Davidson *et al.*, 2008). Ursprünglich wurden sie nur mit

ABC-Transportern in Verbindung gebracht, inzwischen sind jedoch viele weitere Interaktionspartner bekannt (zur Übersicht, siehe Berntsson *et al.*, 2010; Scheepers *et al.*, 2016). Normalerweise interagiert ein SBP mit einem ABC-Transporter und ermöglicht so den Transport von einem Substrat oder einer Klasse an Substraten. Es sind jedoch auch Transporter bekannt, die mit verschiedenen SBPs interagieren wie HisQMP<sub>2</sub> mit den SBPs HisJ und LAO aus *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Heuveling *et al.*, 2014). Ein weiteres Beispiel ist das ‚orphan‘ SBP MppA, welches ein Homolog vom Bindeprotein OppA des ABC-Transporters OppBCDF aus *E. coli* ist (Park *et al.*, 1998; Abbildung 1). Die Gene für ‚orphan‘ SBPs liegen, separiert von den restlichen Genen eines ABC-Transporters, im Genom verstreut vor (Thomas, 2010; Maqbool *et al.*, 2015).

SBPs sind entweder in einer Polypeptidkette mit den TMDs eines Transporters verlinkt, über einen Lipidanker oder eine hydrophobe Helix mit der Membran verbunden (Gram-positive Bakterien und Archaeen) oder frei diffundierbar im Periplasma von Gram-negativen Bakterien (Berntsson *et al.*, 2010). Die monomeren Proteine weisen ein konserviertes Faltungsmuster aus zwei globulären N- und C-terminalen Domänen mit einem zentralen  $\beta$ -Faltblatt aus vier bis sechs  $\beta$ -Strängen umgeben von  $\alpha$ -Helices auf. In Abwesenheit eines Liganden liegen die zwei Domänen in einer offenen Konformation vor. Die Substratbindetasche wird zwischen den Domänen gebildet und die Substratbindung durch Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert (Shilton, 2008). Eine flexible *hinge*-Region stellt ein Verbindungsstück dar und die durch Substratbindung ausgelösten Rotationsbewegungen dieser Region ermöglichen ein Schließen des Proteins (Venusfliegenfalle; Quijcho & Ledvina, 1996) und die Substratübertragung zu den TMDs, wobei jede SBP-Domäne mit einer TMD interagiert.

Die Unterteilung der SBPs in drei Klassen basiert auf Sequenzübereinstimmungen und der Topologie ihrer globulären Domänen (Lee *et al.*, 1999; Fukami-Kobayashi *et al.*, 1999). Klasse I und II SBPs unterscheiden sich in der Anzahl und Anordnung der  $\beta$ -Stränge und der Zusammensetzung der *hinge*-Region, wobei diese in Klasse I aus drei und in Klasse II aus zwei Peptidsegmenten besteht. Im Gegensatz dazu weisen Klasse III SBPs eine *hinge*-Region aus einer langen  $\alpha$ -Helix auf. Weiterführend erfolgte 2010 durch Vergleich der Strukturdaten diverser SBPs eine Kategorisierung in sechs Cluster (A-F) (Berntsson *et al.*, 2010), die 2016 durch ein weiteres Cluster ergänzt wurde (Scheepers *et al.*, 2016). Nennenswert ist hierbei, dass alle kristallisierten Typ II Importer SBPs aus dem Cluster A und Typ I Importer SBPs aus dem Cluster D nutzen (ter Beek *et al.*, 2014). Cluster A-Bindeproteine besitzen als *hinge*-Region eine starre  $\alpha$ -Helix und ermöglichen damit unter Substratbindung nur eine kleine Bewegung der Domänen zueinander. Die Besonderheit der Cluster D ist die Zusammensetzung der *hinge*-Region aus zwei kurzen Strängen, aus jeweils vier bis fünf Aminosäuren, die stärker ausfallende Rotationsbewegungen ermöglichen (Abbildung 2).



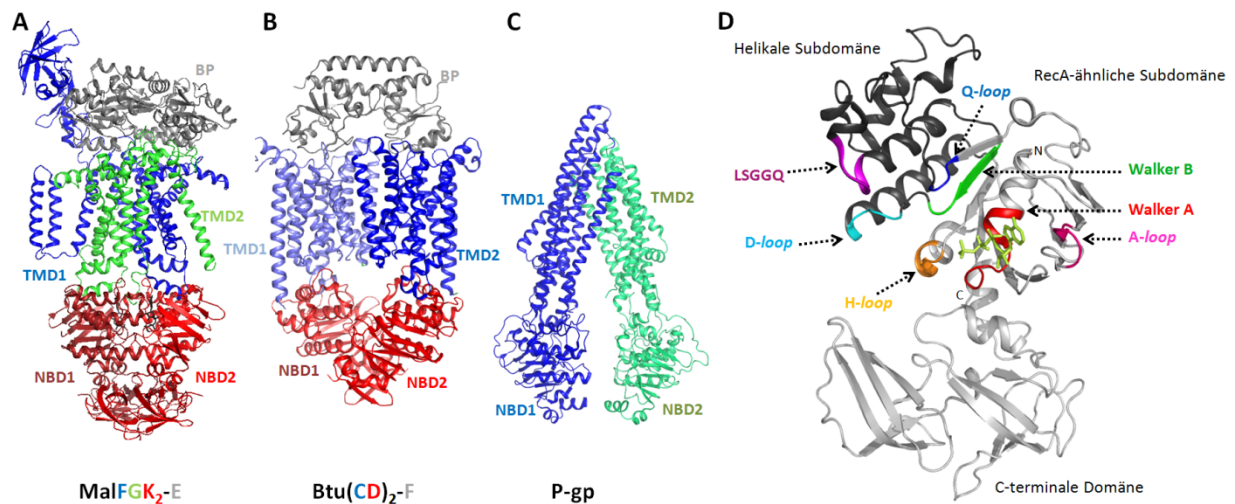
**Abbildung 2: Kristallstrukturen von Substratbindeproteinen der Cluster A (links) und D (rechts) der Typ I/II ABC-Importer.** (A) Links ist das Cluster A/Klasse III Vitamin B<sub>12</sub>-Bindepotein BtuF (PDB: 1N2Z) mit einer starren  $\alpha$ -Helix (grün) als Verbindung zwischen den zwei Domänen dargestellt. Die offene Struktur rotiert unter Substratbindung um 4° (Hvorup *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu enthält das rechts dargestellte Cluster D/Klasse II Maltose-/Maltodextrinbindepotein MalE (PDB: 4MBP) zwei kurze Stränge als *hinge*-Region (grün) und eine C-terminale Extradomäne (orange). Unter Substratbindung bewegen sich die Domänen um einen Winkel von 35° aufeinander zu und die N-terminale Domäne dreht sich um 8° im Uhrzeigersinn (Shilton *et al.*, 1996). Beide Bindeproteine stammen aus *E. coli*. Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMol erstellt (nach Berntsson *et al.*, 2010). N, N-Terminus und C, C-Terminus

Die **Transmembrandomänen** (TMDs) zeigen keine große Sequenzkonservierung, aber eine ähnliche Topologie innerhalb einer Transporterklasse. Sie setzen sich bei Typ I ABC-Importern aus vier bis acht, Typ II Importern aus zehn und ABC-Exportern aus sechs Transmembranhelices (TM-Helices) zusammen (Rees *et al.*, 2009; ter Beek *et al.*, 2014; Abbildung 3 A-C). Trotz der variablen Zahl an TM-Helices in Typ I Importern treten bei allen innerhalb des Transportzyklus strukturelle Umlagerungen von vier Helices im Kern der TMDs auf (Rice *et al.*, 2014). Sowohl bei ABC-Importern als auch bei Exportern erfolgt eine Interaktion des Substrats mit bestimmten Resten der TM-Helices. Innerhalb der Struktur und über Mutationsanalysen in MalF aus *E. coli* wurden zehn spezifische Reste bestimmt, die an der Interaktion mit dem gebundenen Substrat beteiligt sind (Oldham & Chen, 2011 a; Chen, 2013). Im Gegensatz dazu wurde in dem Typ II Vitamin B<sub>12</sub>-Importer aus *E. coli* keine spezifische Bindestelle jedoch ein hydrophober Hohlraum mittig der Membran identifiziert, der von beiden Seiten blockiert werden kann und so das Substrat einschließt (Korkhov *et al.*, 2012). Im ABC-Exporter P-Glykoprotein wurden innerhalb der TMDs mehrere überlappende Bindestellen für Arzneimittel bestimmt (Loo *et al.*, 2003).

Die einzelnen TM-Helices sind über hydrophile Schleifen, die in den Intra- bzw. Extrazellularraum ragen, miteinander verbunden und können Interaktionsbereiche mit den NBDs und SBPs bilden. Ein Beispiel bilden die Kopplungshelices, die durch Hydrolyse von ATP eine Übertragung von Konformationsänderungen der NBDs auf die TMDs ermöglichen (Dawson *et al.*, 2007). Die Kopplungshelices der kanonischen ABC-Importer enthalten das hochkonservierte EAA-Motiv (EAAx<sub>3</sub>Gx<sub>9</sub>LP), welches in der letzten cytoplasmatischen Schleife lokalisiert ist (Saurin *et al.*, 1994). Trotz unterschiedlicher Anordnungen der



Kopplungshelices in allen Transporterklassen interagieren diese in der gleichen Weise mit der  $\alpha$ -helikalen Subdomäne der NBDs über den Q-loop (Mourez *et al.*, 1997; Hunke *et al.*, 2000; Daus *et al.*, 2007; Abbildung 3 D). Ein weiteres Beispiel ist die dritte periplasmatische Schleife von MalG (*scoop loop*) des *E. coli* Typ I Maltoseimporters (Chen, 2013). Diese ragt in die Zuckerbindetasche von MalE und könnte aufgrund der Verlängerung bis zu den ABC-Domänen für die Kopplung von ATP-Hydrolyse und Substrattranslokation verantwortlich sein (Gould & Shilton, 2010). Außerdem bilden ein helikales Segment im Typ II Importer Btu(CD)<sub>2</sub> und zwei intrazelluläre Kopplungshelices (ICL1 und 2) bei ABC-Exportern verbindende Bereiche zwischen den NBDs und TMDs (Dawson & Locher, 2006). Damit kann jede TMD in ABC-Exportern über ICL1 und 2 mit beiden NBDs interagieren, wohingegen bei Importern jede TMD mit nur einer NBD interagiert. Auf der extrazellulären Seite kann analog zum Maltose-/Maltodextrinimporter aus *E. coli* eine zusätzliche große Schleife bei der Interaktion mit dem Bindeprotein eine Rolle spielen (MalF *E. coli*; Oldham *et al.*, 2007).



**Abbildung 3: Kristallstrukturen von drei ABC-Transportern mit unterschiedlicher TMD-Architektur (A-C) und eines NBD-Monomers (D).** Dargestellt sind die Kristallstrukturen vom Typ I ABC-Importer MalFGK<sub>2</sub>-E (PDB: 2R6G) (A), dessen TMDs aus 8 und 6 TM-Helices bestehen sowie vom Typ II ABC-Importer Btu(CD)<sub>2</sub>-F (PDB: 2QI9) (B) mit seinen dicht gepackten 10  $\alpha$ -Helices pro TMD (beide Transporter sind aus *E. coli*). Zusätzlich ist der eukaryotische ABC-Exporter P-Glykoprotein (PDB: 3G61) (C) dargestellt. Dieser *full-size* Transporter setzt sich aus jeweils 6 TM-Helices zusammen. Im Teil (D) ist die Kristallstruktur der NBD MalK aus *E. coli* (PDB: 1Q12) dargestellt (grau). Diese setzt sich aus einer N-terminalen Domäne (helikale und RecA-ähnliche Subdomäne) und einer C-terminalen zusammen. Die RecA-ähnliche enthält das Walker A- (rot) und B- (grün) Motiv, wohingegen in der helikalen Subdomäne das LSGGQ-Motiv (magenta) zu finden ist. Weitere konservierte Schleifenregionen wurden farblich hervorgehoben (A-, D-, H- und Q-loop). Die Funktionen und konservierten Sequenzen der Motive und Schleifenregionen sind in Tabelle 1 aufgelistet. ATP ist als Stab-Modell (hellgrün) dargestellt. Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMol erstellt. N, N-Terminus und C, C-Terminus

Alle ABC-Transporter enthalten zwei **Nukleotidbindedomänen** (NBDs) mit einer konservierten Architektur. Sie sind eine Untergruppe der diversen Superfamilie der P-loop NTPasen, auch bekannt als RecA-ähnliche ATPasen (Vetter & Wittinghofer, 1999) und benötigen für die Katalyse Magnesiumionen. Jedes NBD-Monomer hat einen ungefähren

Kern von 200 Aminosäuren und besteht aus zwei Subdomänen, die über zwei flexible Schleifen miteinander verbunden sind. Das sind einerseits die größere, auch in anderen P-loop ATPasen gefundene RecA-ähnliche Subdomäne und andererseits die einzig bei ABC-Transportern vorkommende  $\alpha$ -helikale Subdomäne (Davidson *et al.*, 2008; Abbildung 3 D), wobei letztere stärker mit den TMDs gekoppelt ist. Die NBD-Monomere liegen in einer „Kopf-an-Schwanz“-Orientierung zueinander und bilden so ein Dimer. In dieser Form können sie zwei ATP-Moleküle an die Nukleotidbindestellen (NBS) binden und dabei ‚sandwichartig‘ umschließen (Smith *et al.*, 2002). Die NBS sind die am meisten konservierten Stellen innerhalb des Proteins und beherbergen ein Satz an Motiven wie das Walker A-, Walker B- und ABC-Signaturmotiv, welche auf dem Sequenzlevel kennzeichnend für die Mitglieder der ABC-Transporter Familie sind (Tabelle 1) (Davidson & Chen, 2004).

**Tabelle 1: Konsensussequenzen und Funktionen der konservierten Motive in den NBDs.** Die Motive wurden entsprechend ihrer Anwesenheit vom N- zum C-Terminus gelistet, wobei der X-loop nur bei ABC-Exportern vorkommt. Konservierte Aminosäuren die entscheidend für die Funktion des jeweiligen Motivs sind, wurden hervorgehoben und unterstrichen. Die Tabelle wurde nach Szöllösi *et al.*, 2017 erstellt.

Motiv	Konsensussequenz	Funktion	Referenz
<b>A-loop</b>	(F/K)x <u>Y</u> <sup>1</sup>	ATP-Bindung	Ambudkar <i>et al.</i> , 2006
<b>Walker A oder P-loop</b>	GxxGxG <u>K</u> (S/T) <sup>1</sup>	ATP-Bindung (Phosphatbindung)	Walker <i>et al.</i> , 1982
<b>Q-loop</b>	hV(S/P) <u>Q</u> <sup>2</sup>	Phosphatbindung, TMD-NBD Kommunikation	Oswald <i>et al.</i> , 2006; Dawson & Locher, 2007
<b>X-loop (Exporter)</b>	TEV <u>G</u> ERG	TMD-NBD Kommunikation	Dawson & Locher, 2006; Kluth <i>et al.</i> , 2015
<b>Signaturmotiv oder C-loop</b>	LS <u>G</u> GQ(K/R)Q	Phosphatbindung, NBD-NBD Kommunikation	Higgins, 1992
<b>Walker B</b>	hhhh <u>DE</u> <sup>2</sup>	ATP-Hydrolyse	Geourjon <i>et al.</i> , 2001
<b>D-loop</b>	SAL <u>D</u>	NBD-NBD Kommunikation, Unidirektionalität des Transports	Jones & George, 2012
<b>H-loop</b>	hA <u>H</u> RL <sup>2</sup>	ATP-Hydrolyse	Zaitseva <i>et al.</i> , 2005

<sup>1</sup>x = beliebiger Rest

<sup>2</sup>h = hydrophober Rest

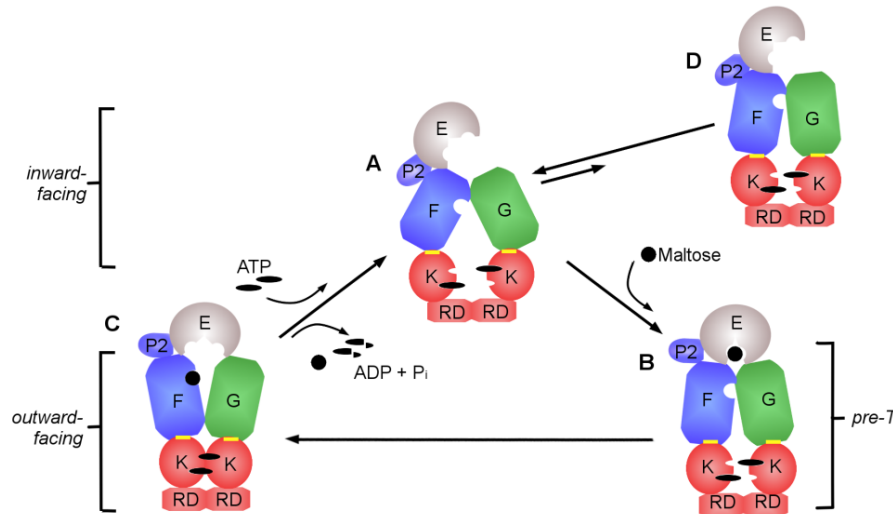
Die konservierten Motive sind essentiell für die Nukleotidbindung, die Hydrolyse und die Kommunikation zwischen den NBDs und TMDs sowie den NBDs untereinander. Jedes ATP-Molekül interagiert mit Motiven von beiden NBDs, dabei ist das ABC-Signaturmotiv des einen Monomers nahe dem Walker A- und B-Motiv und der A-, H- und Q-loops der anderen Domäne gelegen (Smith *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2005; Oswald *et al.*, 2006).

Die NBDs der Exporter enthalten ein zusätzliches Motiv (*X-loop*), welches mit beiden Kopplungshelices der TMDs interagiert.

#### 1.1.4 Der katalytische Zyklus von ABC-Importern

Für ABC-Importsysteme vom Typ I und II wird basierend auf Kristallstrukturen isolierter NBDs und kompletter Transporter sowie biochemischer und biophysikalischer Daten, ein *alternating access* Mechanismus für den Substrattransport vorgeschlagen (Oldham *et al.*, 2007; Rees *et al.*, 2009; Khare *et al.*, 2009). Trotz Abweichungen von diesem Modell im Vitamin B<sub>12</sub>-Importer und anderen Typ II Importsystemen (Hvorup *et al.*, 2007; Lewinson *et al.*, 2010; Goudsmits *et al.*, 2017) deuten zahlreiche Strukturen auf die Allgemeingültigkeit dieses Mechanismus hin (Hollenstein *et al.*, 2007; Kadaba *et al.*, 2008). Namensgebend wird auf Grundlage von strukturellen Änderungen der NBDs innerhalb des katalytischen Zyklus, der Wechsel der TMDs zwischen einer *outward-facing* (geöffnet zur extrazellulären Seite) und einer *inward-facing* (geöffnet zum Cytoplasma) Konformation beschrieben.

Die Details des Mechanismus sollen im Folgenden anhand des am besten charakterisierten Typ I Maltose-/Maltodextrinimporters aus *E. coli*/*Salmonella* Typhimurium näher erläutert werden (Abbildung 4). Der Transporter setzt sich aus den TMDs MalF/MalG, dem NBD-Homodimer MalK<sub>2</sub> und dem periplasmatischen Maltosebindeprotein MalE (MBP) zusammen. Als Besonderheit bestehen die NBDs zusätzlich aus einer C-terminalen regulatorischen Domäne, die beide Monomere während des gesamten katalytischen Zyklus miteinander verbinden (Lu *et al.*, 2005; Grote *et al.*, 2008). Kristallographische Studien deckten mehrere konformative Zustände von MalFGK<sub>2</sub> auf (Oldham *et al.*, 2007; Khare *et al.*, 2009; Oldham & Chen, 2011 a; Chen *et al.*, 2013). Ein ATP-freier Apo-Zustand (PDB: 3FH6) ist unter physiologischer Umgebung wegen sättigenden cytosolischen ATP-Konzentrationen im millimolaren Bereich unwahrscheinlich (Buckstein *et al.*, 2008). Zudem liegt das Bindeprotein MalE in induzierten Zellen mit rund 1 mM in der 30- bis 50-fachen Konzentration gegenüber dem Transporter vor (Manson *et al.*, 1985; Boos & Shuman, 1998). In Abwesenheit von Substrat liegt der ATP-gebundene Transporter in einem *resting state* vor, bei dem die TMDs zum Cytoplasma geöffnet sind (Daus *et al.*, 2007; Oldham *et al.*, 2008). Die Substrataufnahme beginnt mit der Passage der äußeren Membran über eine Maltoporin-vermittelte erleichterte Diffusion, die über das maltodextrinspezifische LamB erfolgt (Boos & Shuman, 1998). Monomeres MalE bindet im Periplasma Maltose und Maltodextrine mit einer Affinität von rund 1 µM (Kellermann & Szmecman, 1974) und durch Annäherung der Domänen um einen Winkel von 35° und einer um 8° im Uhrzeigersinn gefolgten Drehung der N-terminalen Domäne schließt das Protein (Shilton *et al.*, 1996). Ursprünglich wurde vermutet, dass nur geschlossenes substratbeladenes MalE an den Transporter binden kann (Davidson *et al.*, 1992). Mittlerweile wird aber von einer permanenten Verbindung zwischen dem N-Terminus von MalE und dem P2-loop von MalF ausgegangen (Daus *et al.*, 2007, 2009; Grote *et al.*, 2009).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des *alternating access* Modells des Maltose-/Maltodextrinimporters aus *E. coli*/*Salmonella*.** MalF (blau) und MalG (grün) durchspannen die Membran, wobei MalF eine große periplasmatische Schleife (P2) zur Bindung des MBP besitzt und die Kopplungshelices (gelb) unter anderem bei der TMD-NBD Kommunikation unterstützen. Jedes MalK-Monomer besitzt eine NBD und eine C-terminale regulatorische Domäne (RD), über welche sie dauerhaft in Kontakt bleiben. Innerhalb der Zelle herrschen sättigende Konzentrationen an ATP und MBP, sodass ein ATP-freier (Apo-) Zustand des Transporters sehr unwahrscheinlich ist (Buckstein *et al.*, 2008; Manson *et al.*, 1985). In dem *inward-facing* Zustand (A) sind die NBDs mit gebundenem ATP geöffnet und MBP interagiert, sowohl in An- als auch Abwesenheit von Maltose, über die N-terminale Domäne mit dem Transporter. Jedoch binden weder das Nukleotid noch das BP mit einer hohen Affinität an den *inward-facing, resting state*. In einer Zwischenstufe ist die Maltosebindestelle in MalF von beiden Seiten der Membran (B und D) verschlossen und die NBDs sind halboffen. In Abwesenheit von Maltose und damit einer fehlenden Interaktion des Transporters mit der C-terminalen Domäne von MalE, ist der Zwischenzustand nicht stabil (D) und der Transporter kehrt wieder in den *inward-facing* Zustand (A) zurück. In Anwesenheit von Maltose und der Interaktion beider Domänen von MalE mit MalF und MalG (B, *pre-T*) geht der Transporter in den *outward-facing* Zustand (C, katalytisches Intermediat) über, MBP öffnet sich, die NBDs schließen vollständig und Maltose bindet an die Maltosebindestelle in MalF. Die Hydrolyse von zwei ATP destabilisiert die *outward-facing* Konformation der TMDs und bringt den Transporter wieder, unter Freisetzung von Maltose in die Zelle und Austausch von ADP und  $P_i$  gegen ATP, in den *inward-facing* Zustand (A). Maltose kann einen Transportzyklus durch direkte Bindung an den MBP-MalFGK<sub>2</sub>-Komplex (A) oder erst durch Bindung an freiem MBP im Periplasma und folgendem Andocken an den Komplex, initiieren (Böhm *et al.*, 2013).

Der Transportzyklus startet, wenn zusätzlich unter Substratbindung die C-terminale Domäne von MalE an MalG bindet und der Transporter durch strukturelle Änderungen innerhalb der TM-Helices in den Prä-Translokationszustand (*pre-T*, PDB: 3PV0) übergeht. In den letzten Jahren wurden zur Erforschung der ABC-Transporter vermehrt Molekulardynamik (MD)-Simulationen angewendet (Oliveira *et al.*, 2011; Wen & Tajkhorshid, 2011; Li *et al.*, 2014), so auch in Bezug auf die Funktion von MalE. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass in Abwesenheit von substratbeladenem MalE die C-terminale Helix von MalF (TM8) das Schließen von MalK<sub>2</sub> durch Blockade des Translokationswegs verhindert (Hsu *et al.*, 2017). MalE spielt demnach eine wichtige Rolle in der Vermittlung der allosterischen Kommunikation zwischen der MalF-P2-Region und MalK<sub>2</sub> (Grote *et al.*, 2009), erleichtert die ATP-abhängige Schließbewegung der NBDs und stabilisiert damit den *pre-T* Zustand (Weng *et al.*, 2017; Hsu *et al.*, 2017). Als Antwort auf die Bewegungen der TMDs kommen sich die

MalK-Monomere näher. Rotationen der  $\alpha$ -helikalen Subdomäne in Richtung der RecA-ähnlichen Subdomäne des anderen Monomers haben eine Interaktion des Signaturmotivs mit dem Walker A-Motiv des gegenüberliegenden Monomers zur Folge. Nach dem Schließen des MalK-Dimers und durch TMD-NBD Kommunikationen über die Kopplungshelices kommt es zu weiteren Rotationen von einem Teil der TMDs, zu strukturellen Änderungen des MBP und damit zum Übergang des Transporters in die *outward-facing* Konformation (Austermuhle *et al.*, 2004; Oldham *et al.*, 2007). Innerhalb dieser Konformation führen weitere strukturelle Änderungen in den TMDs zum Öffnen des MBP und zur Freisetzung der Maltose in den durch MalFG gebildeten Transportkanal (TM-Helices vier bis acht von MalF und TM-Helices zwei bis sechs von MalG) und der Bindung des Substrats an der in MalF identifizierten Substratbindestelle mit niedriger Affinität (Oldham *et al.*, 2007; Orelle *et al.*, 2008; Oldham *et al.*, 2013). Der *scoop-loop* in MalG (P3-loop) wird durch die Bewegungen innerhalb der TMDs gestreckt, bindet in der Substratbindestasche von MalE und verhindert so eine erneute Bindung des Substrats an das hochaffine MBP. Zusätzlich überträgt dieser möglicherweise die Information zur ATP-Hydrolyse an die ABC-Domänen (Oldham *et al.*, 2013). Die folgenden Schritte sind noch rein spekulativ. Die Hydrolyse von nur einem ATP, was experimentell durch eine Blockade der Freisetzung von ADP durch Vanadat erzielt werden kann, resultierte in keiner oder in nur einer kleinen Öffnung des MalK-Dimers (Daus *et al.*, 2007; Grote *et al.*, 2008). Möglicherweise würde in diesem Zustand das Substrat noch stärker in die Pore gedrückt werden, jedoch kann bis heute eine in diesem Stadium erfolgte Freisetzung des Substrats in das Cytoplasma nicht ganz ausgeschlossen werden (Chen *et al.*, 2001). Die sequentielle Hydrolyse von zwei ATP-Molekülen und folgender Freisetzung des Phosphats destabilisiert hingegen das geschlossene MalK-Dimer und überführt den Transporter in die *inward-facing* Konformation (Orelle *et al.*, 2010). Resultierend aus einer verringerten Affinität der Maltose in MalF wird diese neben ADP und  $P_i$  in das Cytoplasma freigesetzt. Ein erneutes Binden von ATP würde in den am Anfang beschriebenen *resting state* resultieren. Durch direkte Bindung von Maltose an den MBP-MalFGK<sub>2</sub>-Komplex oder erst durch Bindung an freiem periplasmatischem MalE und folgendem Andocken an den Komplex (Böhm *et al.*, 2013) kann ein weiterer Transportzyklus initiiert werden. Insgesamt kommt es bei dem Wechsel von der *inward-* zur *outward-facing* Konformation zu einer in Teilen von MalF um 22° rotierenden Bewegung und um 23° in Teilen von MalG. Im MalK-Dimer ist eine symmetrische Rotation beider Monomere um 14° und eine zusätzliche Rotation der  $\alpha$ -helikalen Subdomäne um ungefähr 8 bis 12° zu beobachten (Khare *et al.*, 2009; Orelle *et al.*, 2010). Die C-terminale regulatorische Domäne bleibt hingegen in allen Transportzuständen unverändert (Samanta *et al.*, 2003; Chen, 2013). Obwohl in diesem Transportmodell zwei ATP-Moleküle für die Translokation eines Maltosemoleküls verbraucht werden, was ebenfalls im Glycin-Betain-Importer von *L. lactis* bestimmt wurde (Patzlaff *et al.*, 2003), ist die genaue Menge an hydrolysiertem ATP und transportierten Substratmolekülen pro Transportzyklus bis heute nicht eindeutig geklärt.

### 1.1.5 Entdeckung eines ABC-Importsystems aus *L. casei* BL23

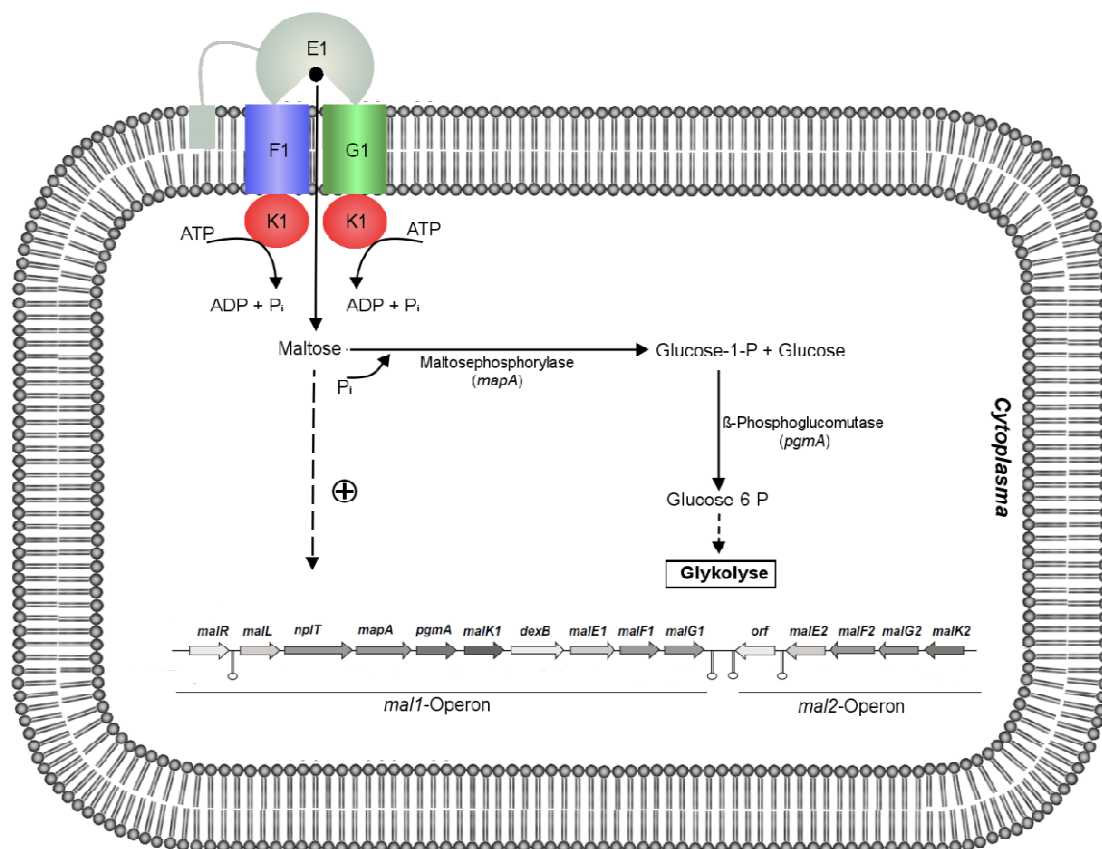
Milchsäurebakterien (*Lactic acid bacteria*, LAB) beziehen ihre Energie größtenteils aus dem Metabolismus von Zuckern. Diese können aus der Umgebung durch in der Zellmembran verankerte ABC-Transportsysteme (Bidossi *et al.*, 2012; Mokhtari *et al.*, 2013; Sauvageot *et al.*, 2017), Zuckerpermeasen oder PTS aufgenommen und hauptsächlich zu Milchsäure abgebaut werden (Le Breton *et al.*, 2005; Bidossi *et al.*, 2012; Joyet *et al.*, 2017). LAB umfassen eine phänotypisch heterogene Gruppe von Gram-positiven, meist Katalase-negativen, säuretoleranten, stäbchenförmigen oder kokkoiden, nichtsporenbildenden und nichtbeweglichen Bakterien. Die größte und vielfältigste Gattung ist *Lactobacillus*, die der Familie Lactobacillaceae und der Ordnung Lactobacillales zuzuordnen ist (Makarova *et al.*, 2006) und sich aus mehr als 200 Arten zusammensetzt. *L. casei* ist ein vielseitiges LAB, das aus verschiedenen Habitaten wie rohen oder fermentierten Milchprodukten, frischem oder fermentiertem Pflanzenmaterial als auch aus der Mundhöhle, dem Gastrointestinal- und Fortpflanzungstrakt von Menschen und Tieren isoliert werden konnte (Kandler & Weiß, 1986; Cai *et al.*, 2007; Toh *et al.*, 2013). Schon 2008 wurde über Sequenzanalysen von LAB ein Gencluster in *L. casei* BL23 identifiziert, welches Gene zur Aufnahme und Verwertung von Maltose und Maltodextrinen enthält (Monedero *et al.*, 2008). 2010 wurde abschließend das einzeln vorliegende und zirkuläre Chromosom mit einer Größe von 3.079.196 Basenpaaren sequenziert (Mazé *et al.*, 2010). Der Ursprung von *L. casei* BL23 ist unbekannt (Acedo-Félix & Pérez-Martínez, 2003). Der Stamm weist zusätzlich probiotische Eigenschaften auf (De Vrese & Schrezenmeir, 2008; Bäuerl *et al.*, 2010; Domínguez Rubio *et al.*, 2017) und wurde bereits ausgiebig für physiologische, genetische und biochemische Studien genutzt (Monedero *et al.*, 2007; Rico *et al.*, 2008; Landete *et al.*, 2010; Sanfelix-Haywood *et al.*, 2011; Munoz-Provencio & Monedero, 2011).

Im Fokus dieser Arbeit steht ein erst kürzlich entdecktes ABC-Importsystem aus *L. casei* BL23 (Monedero *et al.*, 2008; Mazé *et al.*, 2010), welches ein zum MalE-FGK<sub>2</sub>-Transporter aus *E. coli*/*Salmonella* homologes System darstellt. Das 2008 identifizierte Gencluster setzt sich aus zwei Operons zusammen (Monedero *et al.*, 2008) (Abbildung 5). Das *mal1*-Operon umfasst zehn Gene die für einen LacI-Typ Transkriptionsregulator (*malR*), Oligosaccharid-hydrolysierenden Enzymen (*malL*, *dexB* und *npIT* bzw. *dexC*), eine Maltosephosphorylase (*mapA*), eine  $\beta$ -Phosphoglucomutase (*pgmA*) sowie einen ABC-Transporter (*malE1*, *malF1*, *malG1*, *malk1*) kodieren. Das Operon wird durch Maltose induziert, in Anwesenheit von Glucose reprimiert und durch den Transkriptionsregulator MalR reguliert (Monedero *et al.*, 2008). Eine Beziehung des *mal1*-Operons zum Maltosemetabolismus wurde durch Konstruktion einer *mapA*- und *malk1*-Mutante hergestellt, welche die Fähigkeit zum Wachstum auf Maltose oder Maltotriose verloren hatte (Monedero *et al.*, 2008). Durch einen *rho*-unabhängigen Terminator am 3'-Ende von *malG1* wird das erste vom zweiten Operon getrennt. Der zwischen beiden Operons befindliche offene Leserahmen kodiert für ein Protein, welches Ähnlichkeit mit einer Hydrolase der Metallo- $\beta$ -Lactamase Superfamilie hat. Das *mal2*-Operon kodiert wiederum für Homologe der Gene des *mal1*-Operons (*malE2*,

*malF2*, *malG2*, *malK2*) und ist etwa 1,2 Kilobasen stromabwärts vom ersten Operon und in die entgegengesetzte Richtung orientiert. Ursprünglich wurde vermutet, dass das Mal2-Transportsystem für die Aufnahme höherer Oligomere von Maltose zuständig ist (Monedero *et al.*, 2007). Durch die Konstruktion einer *malK2*-Mutante und der damit bestimmten unbeeinflussten Zuckerfermentation ist jedoch die Substratspezifität dieses zweiten ABC-Transportsystems weiterhin unbekannt (Monedero *et al.*, 2008). Auffällig ist ebenfalls das Fehlen von Genen, welche für Enzyme zur Verwertung der aufgenommenen Zucker kodieren.

Der durch das *mal1*-Operon kodierte Transportkomplex besteht aus dem Bindeprotein MalE1 (42 kDa), das über ein konserviertes, lipidmodifiziertes Cystein in der Membran verankert (Sutcliffe & Russell, 1995) und über eine flexible serin-/threoninreiche Linkerregion in räumlicher Nähe zum Transporter gehalten wird. Die TMDs MalF1 (50,4 kDa) und MalG1 (31,7 kDa) weisen, wie auch die homologen *E. coli* Proteine MalF/G, acht und sechs TM-Helices auf. Die zweite extracytoplasmatische Schleife von MalF1 ist wahrscheinlich im Vergleich zur 182 Aminosäuren langen zweiten periplasmatischen Schleife von MalF<sub>*E. coli*</sub> nur zirka 36 Aminosäuren lang (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>; Abbildung 33 im Anhang). Die zwei NBD-Monomere (45,2 kDa, MalK1) sind mit den TMDs assoziiert und setzen sich aus einer N-terminalen Nukleotidbindedomäne und einer zusätzlichen C-terminalen Domäne zusammen.

Die Identifizierung der einzelnen Gene des *mal1*-Operons ermöglichte die Erstellung eines Modells zum Transport und Metabolismus von Maltose in *L. casei* BL23 (Abbildung 5). Demnach wird Maltose über das ABC-Transportsystem MalF1G1K1<sub>2</sub>-E1 in die Zelle aufgenommen und durch die Maltosephosphorylase (*mapA*) in Glucose-1-Phosphat und Glucose gespalten. Glucose-1-Phosphat wird anschließend über eine  $\beta$ -Phosphoglucomutase (*pgmA*) in Glucose-6-Phosphat umgewandelt und Glucose über eine Glucokinase zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert, welches in die Glykolyse eingeschleust werden kann. Das Modell stützt die Hypothese, dass in *L. casei* BL23 das Disaccharid Maltose über ein nicht-PTS-Transportsystem aufgenommen und weiter verstoffwechselt wird (Viana *et al.*, 2000). Interessanterweise wurde über *in vivo* Transportversuche von radioaktiv markierter Maltose ein ungewöhnlich hoher  $K_m$ -Wert bestimmt, der für eine geringe Affinität des Transporters zu diesem Zweifachzucker sprach (Monedero *et al.*, 2008). Durch die Anwesenheit verschiedener Enzyme zur Spaltung von Maltodextrinen (*malL*, *nplT*, *dexB*) innerhalb des Mal1-Systems wurde die Hypothese verstärkt, dass es sich um ein Maltodextrin-ABC-Importsystem handeln könnte (Dippel & Boos, 2005).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Maltoseaufnahme und des Metabolismus sowie Illustration der genetischen Organisation der Maltoseregion in *L. casei* BL23.** Schematisch ist die Aufnahme von Maltose über den im *mal1*-Operon kodierten ABC-Transporter MalF1G1K1<sub>2</sub>-E1 dargestellt. Die Maltoseregion setzt sich aus zwei Operons (*mal1* und *mal2*) zusammen. Das *mal1*-Operon enthält Gene zur Aufnahme und Verwertung von Zuckern und wird durch aufgenommene Maltose induziert, in Anwesenheit von Glucose reprimiert und durch den Transkriptionsregulator MalR reguliert. Außerhalb der Zelle vorkommende Maltose wird durch MalE1 komplexiert, ATP-abhängig über den Transportkomplex in die Zelle aufgenommen und über Produkte von *mapA* und *pgmA* weiter zu Glucose-6-Phosphat umgewandelt und in die Glykolyse eingeschleust. Die Abbildung wurde verändert nach Monedero *et al.*, 2008.

## 1.2 Regulation des Kohlenstoffmetabolismus

Die Katabolitrepression (*carbon catabolite repression*, CCR) ist ein regulatorischer Mechanismus von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, der es ihnen ermöglicht, ausgewählte Substrate aus der Umwelt zu verwenden und Energie zu konservieren. CCR wurde erstmals 1942 durch Jaques Monod beschrieben, der Zucker in Klasse A (zum Beispiel Glucose, Sucrose oder Fructose) und B (Maltose, Lactose oder Galactose) unterteilte und beim Wachstum von Bakterien in einem chemisch definierten Medium aus beiden Zuckerklassen ein biphasisches, diauxisches Wachstum beobachtete (Monod, 1942). Die bevorzugte Verwertung eines Klasse A Zuckers in Anwesenheit eines Klasse B Zuckers wird in vielen Organismen durch eine Kombination aus globalen Mechanismen, hauptsächlich auf dem Level der Transkription, als auch operonspezifischen regulatorischen Mechanismen vermittelt, wie zum Beispiel dem Induktorausschluss (1.2.1, 1.2.2). Auffälliger Weise



unterliegen fünf bis zehn Prozent aller bakteriellen Gene der Katabolitrepression (Görke & Stülke, 2008).

Obwohl die wichtigsten CCR-Mechanismen in Enterobakterien und Firmicutes sehr unterschiedlich sind (1.2.1, 1.2.2), spielen bei allen Komponenten des Phosphoenolpyruvat (PEP)-PTS und die Proteinphosphorylierung eine wesentliche Rolle (Postma *et al.*, 1993). Es sind jedoch auch einige Ausnahmen von PTS-unabhängigen CCR-Mechanismen in verschiedenen nichtenterischen Bakterien und Streptomyceten bekannt (Cvitkovitch *et al.*, 1995). Das 1964 entdeckte Gruppentranslokationssystem stellt eine Phosphorylierungskaskade dar und die Gene für ein zuckerspezifisches PTS sind normalerweise in einem Operon organisiert, das zusätzlich Gene für den Katabolismus des transportierten Substrats enthält (zur Übersicht, siehe Lengeler, 2015). Ein PTS besteht aus den cytoplasmatischen Proteinen Enzym I (EI) und dem Phosphorylcarrierprotein HPr (*histidine-containing* oder *heat-stable protein*) sowie den Enzym II (EII)-Komplexen. Diese setzen sich im Allgemeinen aus den zwei hydrophilen Domänen EIIA und EIIB, der hydrophoben integralen Membrandomäne EIIC sowie bei Mannose-Typ-PTS zusätzlich aus EIID zusammen. Mindestens zwei dieser Proteine können miteinander fusioniert sein und bilden so Multidomänenproteine (zur Übersicht, siehe Deutscher *et al.*, 2006). Die katalytischen Funktionen von EI, HPr und EIIA hängen jeweils von einem funktionellen Histidin, in EIIB von einem Cystein oder Histidin ab (Deutscher *et al.*, 2006; Pas *et al.*, 1991). Im Gegensatz zu den EII-Komplexen sind EI und HPr nicht selektiv für ein Substrat und werden durch verschiedene PTS genutzt. In Abhängigkeit von der Sequenz und der Zusammensetzung der Membrankomponenten werden sieben PTS-Familien für den Transport von Glucose, Fructose, Lactose, Glucitol, Galactitol, Mannose und L-Ascorbat unterschieden (Barabote & Saier, 2005). *L. casei* Stämme enthalten eine Vielzahl an vorwiegend zur Mannose-Familie gehörigen PTS (Klaenhammer *et al.*, 2002).

Am Anfang der Phosphorylierungskaskade steht aus der Glykolyse stammendes PEP, welches als Energiequelle und Phosphoryldonor dient. EI katalysiert in einer reversiblen Reaktion den Phosphorylgruppentransfer von PEP auf HPr unter Bildung von Pyruvat (Kundig *et al.*, 1964). Anschließend wird die Phosphorylgruppe von P~His15-HPr auf EIIB und schließlich über einen irreversiblen Schritt auf das durch die EIIC(D)-Domänen gebundene Substrat übertragen. Dieser Schritt verringert die Affinität des Substrats zu EIIC und das modifizierte Substrat wird in das Cytoplasma freigesetzt (Cao *et al.*, 2011). Bislang ist in *L. casei* nur von Fucosyl- $\alpha$ -1,3-N-Acetylglucosamin bekannt, dass dieses ohne Phosphorylierung über ein PTS aufgenommen wird (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2012). Alle anderen Kohlenhydrate werden während des Transports phosphoryliert und anschließend in phosphorylierte Intermediate des Embden-Meyerhof-Parnas-, Pentose-Phosphat- oder Entner-Doudoroff-Weg umgewandelt.

### 1.2.1 Katabolitrepression in Enterobacteriaceae

Innerhalb der CCR in den Enterobakterien spielen der Transkriptionsaktivator *Crp* (cyclic AMP (cAMP) receptor protein), das Signalmetabolit cAMP, die Adenylatzyklase und die EIIA-Komponente des glucosespezifischen PTS (EIIA<sup>Glc</sup>) eine wichtige Rolle. In Abwesenheit von Glucose bleibt EIIA<sup>Glc</sup> phosphoryliert und stimuliert die membranständige Adenylatzyklase, welche ATP zu cAMP umwandelt (Park *et al.*, 2006) (Abbildung 6 A). Das gebildete cAMP bindet an *Crp* und der resultierende Komplex fungiert als Transkriptionsaktivator für die Expression von Operons zur Verwertung von Klasse B Zuckern (zur Übersicht, siehe Deutscher *et al.*, 2006). In Anwesenheit von Glucose oder anderen PTS-Substraten bleibt EIIA<sup>Glc</sup> unphosphoryliert und die Adenylatzyklase somit inaktiv. Auf Proteinebene greift in diesem Fall der zweite wichtige Mechanismus der CCR, der Induktorausschluss. Durch die Interaktion des dephosphorylierten EIIA<sup>Glc</sup> mit Proteinen von verschiedenen nicht-PTS-Zuckertransportsystemen werden diese in ihrer Aktivität inhibiert und verhindern so die Aufnahme alternativer Kohlenstoffquellen. In *E. coli* und *S. Typhimurium* interagiert EIIA<sup>Glc</sup> u.a. mit der Glycerinkinase (Postma *et al.*, 1984), der ATP-Bindedomäne des Maltose/Maltodextrin ABC-Importsystems (Dean *et al.*, 1990; Kühnau *et al.*, 1991) und mit der Lactosepermease (LacY) (Osumi & Saier, 1982; Sondej *et al.*, 2002) (Abbildung 6 A).

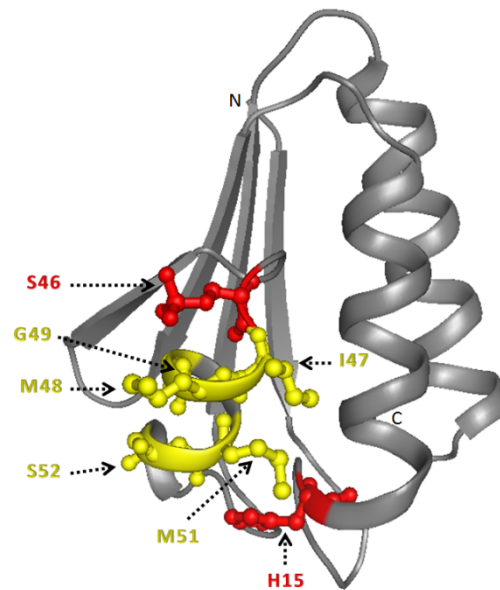
In Bezug auf das ABC-Transportsystem MalFGK<sub>2</sub> kann EIIA<sup>Glc</sup> direkt an die Malk-Untereinheiten binden und damit die weitere Aufnahme von Maltose verhindern (Chen, 2013; Wuttge *et al.*, 2016). *In vitro* konnte die Inhibierung über eine reduzierte ATPaseaktivität des Transportkomplexes nachgewiesen werden (Dean *et al.*, 1990, Landmesser *et al.*, 2002). Auf der Grundlage von Malk-Mutanten wurde einerseits eine Interaktion des Inhibitors mit der C-terminalen regulatorischen Domäne von Malk (Dean *et al.*, 1990; Kühnau *et al.*, 1991; Böhm *et al.*, 2002) und andererseits, basierend auf der Kristallstruktur des Malk-Dimers, mit der NBD des einen und der regulatorischen Domäne des anderen Monomers postuliert (Samanta *et al.*, 2003). Durch die Kristallisation des gesamten Transporters im Komplex mit EIIA<sup>Glc</sup> wurde die zweite Annahme bestätigt und zusätzlich eindeutig gezeigt, dass zwei EIIA<sup>Glc</sup>-Moleküle pro Transporter gebunden werden (Chen *et al.*, 2013). Quervernetzungsversuche zeigten außerdem, dass EIIA<sup>Glc</sup> keine Präferenz zu einem bestimmten Konformationszustand des Transporters hat und damit die Kontaktstellen in Malk während des katalytischen Zyklus weitestgehend unverändert bleiben (Wuttge *et al.*, 2016). Demnach kann der Inhibitor entweder an den *inward-facing* Zustand des Transporters binden und so trotz der Komplexierung mit ATP und MalE/Maltose das Malk-Dimer am Schließen hindern (Chen *et al.*, 2013; Wuttge *et al.*, 2016) oder an die *outward-facing* Konformation, in welcher das Malk-Dimer am Öffnen gehindert wird und durch einen Zyklus der ATP-Hydrolyse im halbgeöffneten ADP-gebundenen Zustand verbleibt (Bao & Duong, 2013).



**Abbildung 6: PTS-katalysierte Glucoseaufnahme und Funktionen des PTS während der Regulation des Kohlenhydratmetabolismus in *E. coli* (A) und Firmicutes (B).** In *E. coli* setzt sich das Glucose-PTS aus den Komponenten EIIA<sup>Glc</sup>, EIIBC<sup>Glc</sup> und das *L. casei* BL23 Glucose-/Mannose-PTS aus EIIB<sup>Man</sup>, EIIC<sup>Man</sup> und EIID<sup>Man</sup> zusammen (grau hinterlegt). HPr wird in Anwesenheit von PEP durch EI am katalytischen Histidin phosphoryliert. Die Phosphorylgruppe wird auf EIIA übertragen, welches in *E. coli* einzeln (A) oder in *L. casei* fusioniert mit EIIB (B) im Cytoplasma vorliegt. Von EIIA wird die Phosphorylgruppe auf EIIB übertragen, welche an die integralen Membrandomänen gebunden sind. Das Glucosemolekül wird während der Aufnahme über EIIC (*E. coli*) oder den Transmembrantransporter EIIC/D (*L. casei*) durch EIIB phosphoryliert und gelangt so in Form von Glucose-6-Phosphat in die Zelle. In Abwesenheit von Glucose bleibt EIIA<sup>Glc</sup> in *E. coli* phosphoryliert (A), stimuliert die Aktivität der Adenylatzyklase (AZ) und erhöht damit die Konzentration an cAMP in der Zelle. Die Bindung von cAMP an den transkriptionellen Regulator *Crp* resultiert in einen Komplex, der die Transkription von Zielgenen stimuliert (positive Regulation). In Abwesenheit von Glucose liegt EIIA<sup>Glc</sup> unphosphoryliert vor und kann die AZ nicht aktivieren. In diesem Fall bindet und inaktiviert EIIA<sup>Glc</sup> metabolische Enzyme und Transporter von sekundären Kohlenstoffquellen wie die Glycerinkinase (GlpK), Lactosepermease (LacY) und MalK des maltose-/maltodextrinspezifischen ABC-Transportsystems (Induktorausschluss). In Firmicutes (B) stimuliert das während der Glykolyse gebildete FBP die Aktivität der HprK/P und phosphoryliert HPr am Ser46 in Anwesenheit von ATP oder PP<sub>i</sub>. Die Bindung von zwei P-Ser46-HPr an ein *CcpA*-Dimer resultiert in einen Komplex, der an eine *cre*-Sequenz bindet und je nach Lokalisation der *cre*-Sequenz die Transkription von Zielgenen zur Verwertung alternativer Zuckerquellen inhibiert (negative Regulation) oder von Genen, welche im Glucosemetabolismus essentiell sind, aktiviert (positive Regulation). In einigen Gram-positiven Bakterien, wie zum Beispiel *L. casei* oder *L. lactis*, inhibiert P-Ser46-HPr zusätzlich die Maltoseaufnahme durch Induktorausschluss, resultierend aus einer Interaktion mit dem korrespondierenden ABC-Transportsystem. Außerdem kann in Abwesenheit von Glucose die Phosphorylgruppe von P~His-HPr auf nicht-PTS-Proteine wie die Glycerinkinase (GlpK), Antiterminatoren (AT) und transkriptionellen Aktivatoren (TA) übertragen werden, resultierend in einer Stimulation und erhöhten Expression von Operons für die Verwertung von sekundären Zuckern.

### 1.2.2 Katabolitrepression in Firmicutes

Auf Transkriptionsebene nutzen alle untersuchten Gram-positiven Firmicutes den gleichen Weg der cAMP-unabhängigen Katabolitrepression (Görke & Stülke, 2008). Eine wesentliche Rolle spielen das *catabolite control protein A* (*CcpA*), welches ein Mitglied der LacI/GalR-Transkriptionsregulatorfamilie ist (Henkin *et al.*, 1991), das HPr des PTS, die HPr Kinase/Phosphorylase (HprK/P) und die glycolytischen Intermediate Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP) und Glucose-6-Phosphat. Im Gegensatz zu anderen LacI/GalR-Proteinen wird *CcpA* erst durch die Bildung eines Komplexes mit dem Korepressor P-Ser46-HPr (phosphoryliert durch HprK, Details siehe unten) zur DNA-Bindung aktiviert und reguliert die Expression von Genen durch Bindung des Komplexes an eine *cre*- (*catabolite response element*) Sequenz (Fujita & Miwa, 1994; Gösseinger *et al.*, 1997; Galinier *et al.*, 1999). Diese ist bei katabolitaktivierten Operons vor dem Promotor lokalisiert oder im Fall von katabolitreprimierten Operons überlappend oder stromabwärts der Promotorregion gelegen (Hueck *et al.*, 1994; Stülke & Hillen, 2000) (Abbildung 6 B). Die Aminosäuren I47, M48 sowie M51 (Abbildung 7) in P-Ser46-HPr sind essentiell für die Interaktion des phosphorylierten Proteins mit *CcpA* (Schumacher *et al.*, 2004; Deutscher *et al.*, 2006). Eine mutmaßliche *cre*-Bindestelle wurde 31 Basenpaare stromaufwärts von der *malL*-Translationsinitiationsstelle in *L. casei* BL23 entdeckt und ist 14 Basenpaare lang. Über Northern-Blot-Analysen von zwei *L. casei* Mutanten wurde außerdem die Notwendigkeit von *CcpA* und dem Korepressor P-Ser46-HPr in der Katabolitrepression des *mal1*-Operons bestimmt (Monedero *et al.*, 2008).



**Abbildung 7: Kristallstruktur von HPr aus *Enterococcus faecalis*** (PDB: 1FU0). Die zu phosphorylierenden Reste His15 und Ser46 sind rot dargestellt. Weitere Reste die für Interaktionen mit der bifunktionalen HprK/P (Met48, Gly49, Ser52) sowie *CcpA*, *EI*, verschiedenen EIIAs oder nicht-PTS-Permeasen (hydrophobe Bereich aus Ile47, Met48, Met51) relevant sind, wurden gelb hervorgehoben. Die einzelnen Reste wurden als Kugel-Stab-Modell dargestellt. Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMol erstellt. N, N-Terminus; C, C-Terminus

Zusätzlich vermittelt P-Ser46-HPr den Induktorausschluss (zur Übersicht, siehe Stülke & Hillen, 1999; Titgemeyer & Hillen, 2002). Das HPr aus *L. casei* BL23 besteht aus 88 Aminosäuren und kann innerhalb des PTS an Histidin 15 und Serin 46 phosphoryliert werden (Galinier *et al.*, 1998; Poncet *et al.*, 2004). Die PEP-abhängige, durch das Enzym I katalysierte, Phosphorylierung am His15 hat einerseits eine regulatorische Bedeutung in der Aufnahme und Verstoffwechselung von PTS-Substraten, andererseits kann die Phosphorylgruppe auf nicht-PTS-Proteine wie die Glycerinkinase (Charrier *et al.*, 1997), Antiterminatoren (SacT, SacY oder LicT) oder transkriptionellen Aktivatoren (LevR oder MtlR) übertragen werden (Tortosa *et al.*, 1997; Stülke *et al.*, 1998; Lindner *et al.*, 1999) (Abbildung 6 B). Die Aktivierung dieser nicht-PTS-Proteine resultiert demzufolge in einer erhöhten Expression von Operons zur Verwertung von Klasse B Zuckern.

Die zweite ATP-abhängige Phosphorylierung von HPr erfolgt durch die metabolitkontrollierte und bifunktionale HprK/P (Galinier *et al.*, 1998; Brochu & Vadeboncoeur, 1999). Diese reagiert auf veränderte Konzentrationen an ATP, anorganischem Phosphat ( $P_i$ ) bzw. Pyrophosphat ( $PP_i$ ) sowie FBP und steht während der Phosphorylierung mit HPr über die Reste M48, G49 und S52 in Kontakt (Fieulaine *et al.*, 2002) (Abbildung 7). Die Proteinmonomere des homohexameren Enzyms setzen sich aus einer für die katalytische Funktion verantwortlichen C-terminalen Domäne und einer N-terminalen mit unbekannter Funktion zusammen (Fieulaine *et al.*, 2001). Die C-terminale Domäne enthält ein Walker A-Motiv, welches einen typischen P-loop bildet (Galinier *et al.*, 1998). Die Kinasefunktion des Proteins ist während des Wachstums auf Klasse A Zuckern durch die vermehrte Bildung von

FBP und einer Abnahme der Phosphatkonzentration erhöht (Vadeboncoeur *et al.*, 1991; Monedero *et al.*, 2001 b). Da gebildetes P-Ser46-HPr ein schlechtes Substrat für die PEP-abhängige Phosphorylierung durch P~EI ist, verlangsamt es den PTS-Transport (Reizer *et al.*, 1984; Deutscher *et al.*, 1984) und vermittelt in Laktokokken (Monedero *et al.*, 2001 a) und Laktobazillen (Ye *et al.*, 1994) den Induktorausschluss.

In *L. casei* BL23 wurde durch die Konstruktion verschiedener HPr-Varianten die Relevanz von P-Ser46-HPr im Induktorausschluss von nicht-PTS-Zuckern bestätigt. Substitutionen wie S46A, S46T und I47T führten in den mutierten *L. casei* Stämmen zur Aufhebung der CCR und zeigten beim gleichzeitigen Wachstum auf Glucose und Klasse B Zuckern eine kurze diauxische lag-Phase (Viana *et al.*, 2000; Mazé *et al.*, 2004). Gründe dafür waren eine abgeschwächte bzw. fehlende Phosphorylierung durch die HprK/P. Schlussfolgernd wurde eine Beteiligung des aus den Aminosäuren I47, M48 und M51 gebildeten hydrophoben Bereichs in HPr nicht nur an der Interaktion mit EI und EIIA vermutet, sondern auch mit nicht-PTS-Permeasen (zur Übersicht, siehe Deutscher *et al.*, 2006). Zusätzlich wurden verschiedene HprK/P-Mutanten isoliert, die eine normale Kinasefunktion jedoch fast keine Phosphorylaseaktivität aufwiesen. Eine Deletion der N-terminalen Domäne ( $\Delta$ 1-127) des Proteins hatte keinen Einfluss auf die bifunktionale Aktivität der HprK/P (Monedero *et al.*, 2007; Chaptal *et al.*, 2007). Die Substitution von V267F innerhalb des konservierten Zentralloops (265-275) der C-terminalen Domäne, welcher mit dem Walker A-Motiv des benachbarten Monomers interagiert, führte interessanterweise zu einer permanenten Phosphorylierung von HPr am Ser46 (Monedero *et al.*, 2001 b). Grund für die fehlende Phosphorylaseaktivität war eine durch die Mutation ausgelöste Konformationsänderung, die einen Verlust der Arg245-P-Ser46-HPr-Interaktion zur Folge hatte (Fieulaine *et al.*, 2002). Zusätzlich wurde nur noch eine ATP-abhängige, aber keine PP<sub>i</sub>-abhängige Kinaseaktivität bestimmt (Chaptal *et al.*, 2007). Durch permanent hohe Konzentrationen an P-Ser46-HPr wurde mithilfe dieser Konstrukte über *in vivo* Versuche eine verringerte Maltoseaufnahme nachgewiesen (Monedero *et al.*, 2008). Der Inhibitor wird dabei, ähnlich zum homologen *E. coli* Mal-System, mit einer oder mehreren Komponenten des ABC-Transporters MalF1G1K1<sub>2</sub> interagieren und so eine hemmende Wirkung ausüben (Monedero *et al.*, 2007, 2008). Auf Grundlage von Aminosäuresequenzvergleichen der ATPasen aus *E. coli* und *L. casei* BL23 (46 % Übereinstimmung) wäre eine Interaktion mit MalK1 möglich (Monedero *et al.*, 2007, 2008). Durch eine Bindung des Inhibitors an die  $\gamma$ -Phosphatbindestelle in der Nukleotidbindetasche von MalK1, vergleichbar zu Vanadat (Oldham & Chen, 2011 b), könnte das Protein zusätzlich mit den C-Termini von MalF1 und MalG1 in Kontakt stehen. Diese Hypothese wird durch Hefe-2-Hybridsystem Experimente gestützt. Dabei wurde eine Interaktion von phosphoryliertem HPr mit einem Fragment von MdxG (Yvdl) aus *Bacillus subtilis* bestimmt (J. Deutscher, persönliche Mitteilung), welches homolog zu MalG1 ist.

### 1.3 Zielstellung der Arbeit

Die bereits in Bezug auf den Gram-positiven Organismus *L. casei* BL23 durchgeführten physiologischen, genetischen und biochemischen Untersuchungen deckten ein ABC-Importsystem für Zucker auf, welches über P-Ser46-HPr reguliert wird. Wachstumsversuche und die im Operon kodierten Enzyme deuteten auf einen Maltose-/Maltodextrinimporter vergleichbar zum *E. coli* ABC-Importsystem hin.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollte die Substratspezifität von MalE1 mithilfe verschiedener Methoden ermittelt werden. Zusätzlich war es das Ziel MalE1 in Anwesenheit verschiedener Oligoglucoside zu kristallisieren und mithilfe der dreidimensionalen Strukturen die Zuckerbindestelle mit anderen bereits publizierten Strukturen zu vergleichen.

Der zweite Teil der Dissertation widmete sich der Regulation des ABC-Importers. Zu diesem Zweck sollte der Transporter zunächst in eine geeignete Lipidumgebung eingebaut und die ATPaseaktivität in Anwesenheit verschiedener Zucker und P-Ser46-HPr bestimmt werden. So sollten *in vitro* die bereits publizierten *in vivo* Versuche zur Relevanz von P-Ser46-HPr innerhalb des Induktorausschlusses in *L. casei* BL23 näher untersucht werden. Weiterhin sollte der genaue Bindungsbereich von P-Ser46-HPr innerhalb des Transporters, vergleichbar zu MalK<sub>2</sub>-EIIA<sup>Glc</sup> aus *E. coli/Salmonella*, mithilfe von Quervernetzungsexperimenten und massenspektrometrischer Analysen näher identifiziert und zusätzlich der Einfluss der P-Ser46-HPr-Bindung auf die ATP-Bindung untersucht werden.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Charakterisierung des Bindeproteins MalE1

Nach Vergleich der genetischen und biochemischen Daten bekannter komplexierter Bindeproteine mit der Sequenz und einem über I-TASSER (Yang *et al.*, 2015) berechneten Strukturmodell von MalE1 (nicht dargestellt) wurden die höchsten Übereinstimmungen mit dem Maltodextrin-/Cyclodextrinbindeprotein aus *Thermoactinomyces vulgaris* (24 %; 1,6 Å *root mean square deviation (rmsd)* zwischen den C $\alpha$ -Atomen; Matsumoto *et al.*, 2009) und dem Maltose-/Maltodextrinbindeprotein aus *E. coli* (24 %; 2,3 Å *rmsd* zwischen den C $\alpha$ -Atomen; Quijcho *et al.*, 1997) bestimmt. Abgeleitet aus diesen Homologien wurden zur Eingrenzung des Substratspektrums von MalE1 Bindungsstudien mittels isothermaler Titrationskalorimetrie, Fluoreszenzspektroskopie, als auch Kompetitionsstudien mit [ $^{14}$ C]-Maltotetraose nicht nur in Anwesenheit von linearen, sondern auch zyklischen Zuckern durchgeführt. Getestete Zucker waren Maltose, Maltotriose, Maltotetraose und Maltopentaose als auch  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin, welche sich aus sechs, sieben und acht Glucosemonomeren zusammensetzen. Zusätzlich wurde die dreidimensionale Struktur von MalE1 in Kooperation mit Dr. M. Bommer (Humboldt-Universität zu Berlin) experimentell ermittelt.

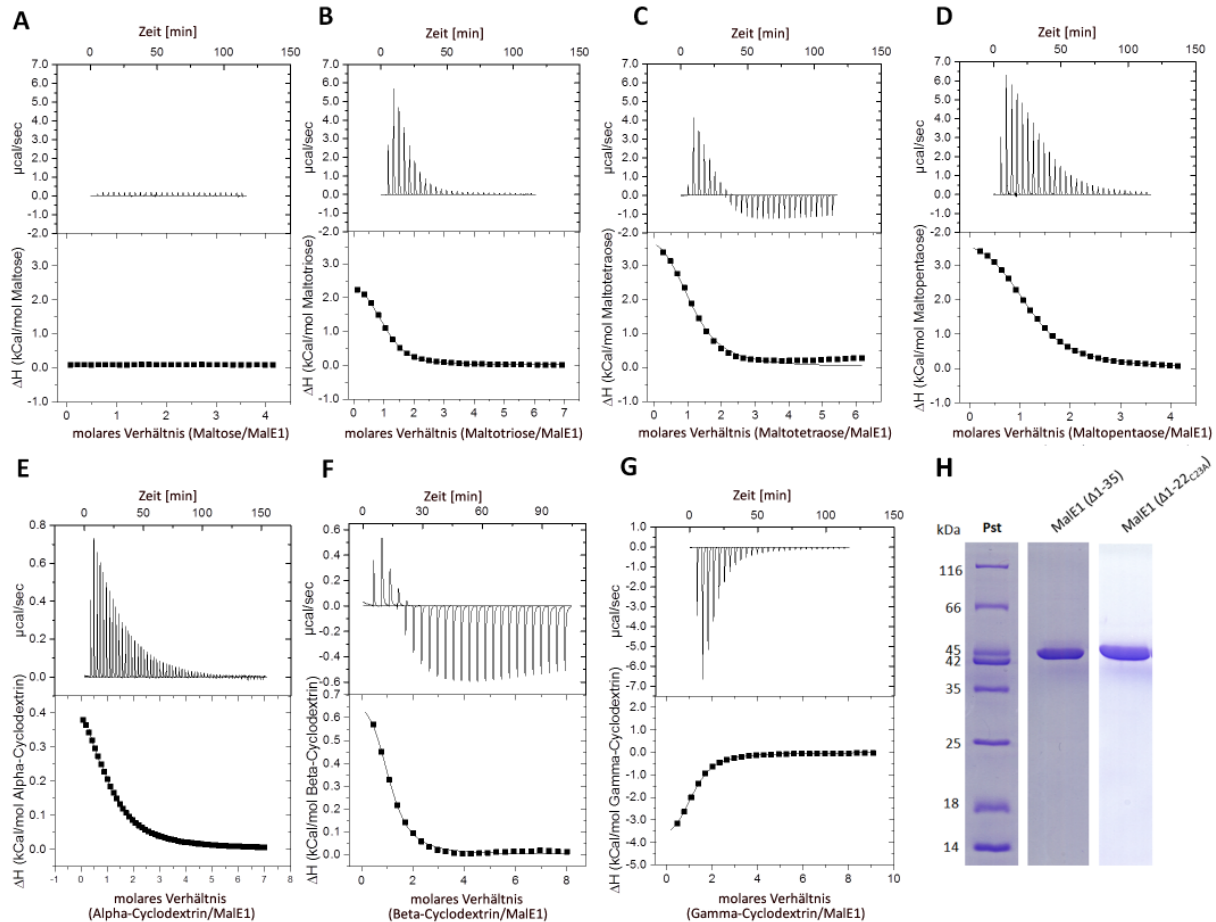
#### 2.1.1 Isolation von MalE1 aus *E. coli*

Die heterologe Überexpression von MalE1, mit oder ohne Linkerregion, erfolgte in *E. coli* BL21 T1 DE3 (4.2.5) unter Verwendung der Plasmide pGL1 und pCH1. Durch das Fehlen der natürlichen Signalsequenz und der damit verbundenen fehlenden Translokation der Proteine über die Membran verblieben beide Bindeproteinvarianten im Cytosol von *E. coli*. Die N-terminale Fusion der Proteine mit einem His $_6$ -Tag ermöglichte die anschließende Isolation der Bindeproteine über eine Cobalt-Affinitätschromatographie (4.3.1). Dabei konnte aus einem Liter Kultur 10 mg MalE1( $\Delta$ 1-22 $_{C23A}$ ) beziehungsweise 50 mg MalE1( $\Delta$ 1-35) gewonnen werden (Abbildung 8 H).

#### 2.1.2 Substratbindungstests über isothermale Titrationskalorimetrie

Die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) wurde als eine hochsensitive Methode genutzt, um erstmals Substrataffinitäten des isolierten MalE1 zu linearen und zyklischen Zuckern zu bestimmen (4.4.2). Die erhaltenen Bindungskurven in Abbildung 8 weisen Affinitäten des SBP's MalE1 zu den linearen Zuckern Maltotriose (Abb. 8 B), Maltotetraose (Abb. 8 C), Maltopentaose (Abb. 8 D) sowie zu den zyklischen Zuckern  $\alpha$ - (Abb. 8 E),  $\beta$ - (Abb. 8 F) und  $\gamma$ -Cyclodextrin (Abb. 8 G) nach. Im Gegensatz dazu wurde in Anwesenheit von bis zu 6 mM Maltose keine Bindung durch MalE1 bestimmt (Abb. 8 A).





**Abbildung 8: Mittels isothermaler Titrationskalorimetrie erhaltene Bindungskurven von MalE1.** 300  $\mu\text{M}$  MalE1( $\Delta 1-35$ ) wurde in 30 Schritten gegen 6 mM Maltose (A), Maltotriose (B), Maltotetraose (C), Maltopentaose (D),  $\alpha$ -Cyclodextrin (E),  $\beta$ -Cyclodextrin (F) oder  $\gamma$ -Cyclodextrin (G) titriert. Die bei einer Bindung erhaltenen Peaks wurden integriert und die resultierenden Reaktionswärmen gegen das molare Verhältnis zwischen Substrat und Protein aufgetragen. MalE1 zeigte Affinitäten zu allen getesteten Maltodextrinen und zu den zyklischen Zuckern, jedoch nicht zu Maltose. (H) Auftragung beider Bindeproteinvarianten auf ein 15 %iges SDS-Gel. Spur 1: Pst, Proteinstandard, Spur 2: 2  $\mu\text{g}$  MalE1( $\Delta 1-35$ ) (42 kDa), Spur 3: 2  $\mu\text{g}$  MalE1( $\Delta 1-22_{C23A}$ ) (43 kDa).

Die Komplexbildung mit Maltotriose, Maltopentaose und  $\alpha$ -Cyclodextrin resultierte jeweils in einer endothermen Reaktion ( $\Delta H$  positiv), wohingegen die exotherme  $\gamma$ -Cyclodextrinbindung eine Verringerung der resultierenden Wärmemengen während der Reaktion zur Folge hatte ( $\Delta H$  negativ) (Tabelle 2). MalE1 zeigte in Anwesenheit von Maltotetraose und  $\beta$ -Cyclodextrin zunächst eine endotherme Bindungsreaktion, die schließlich in eine geringe exotherme Pufferreaktion überging. Diese resultierte wahrscheinlich aus Verdünnungseffekten mit dem Puffer oder im Fall von  $\beta$ -Cyclodextrin aus der Verdünnung des Lösemittels DMSO in wässrigen Puffer. Bei der Auswertung der Daten über Origin5 wurde dieser Puffereffekt berücksichtigt und für die Bindung der getesteten Malto- und Cyclodextrine Dissoziationskonstanten im  $\mu\text{M}$ -Bereich bestimmt (Tabelle 2). Die schlechteste Affinität hatte MalE1 mit einem  $K_d$  von 143  $\mu\text{M}$  zu  $\alpha$ -Cyclodextrin, wohingegen die Bindungskonstanten aller anderen Substrate in etwa im gleichen Bereich bei 50  $\mu\text{M}$  lagen.

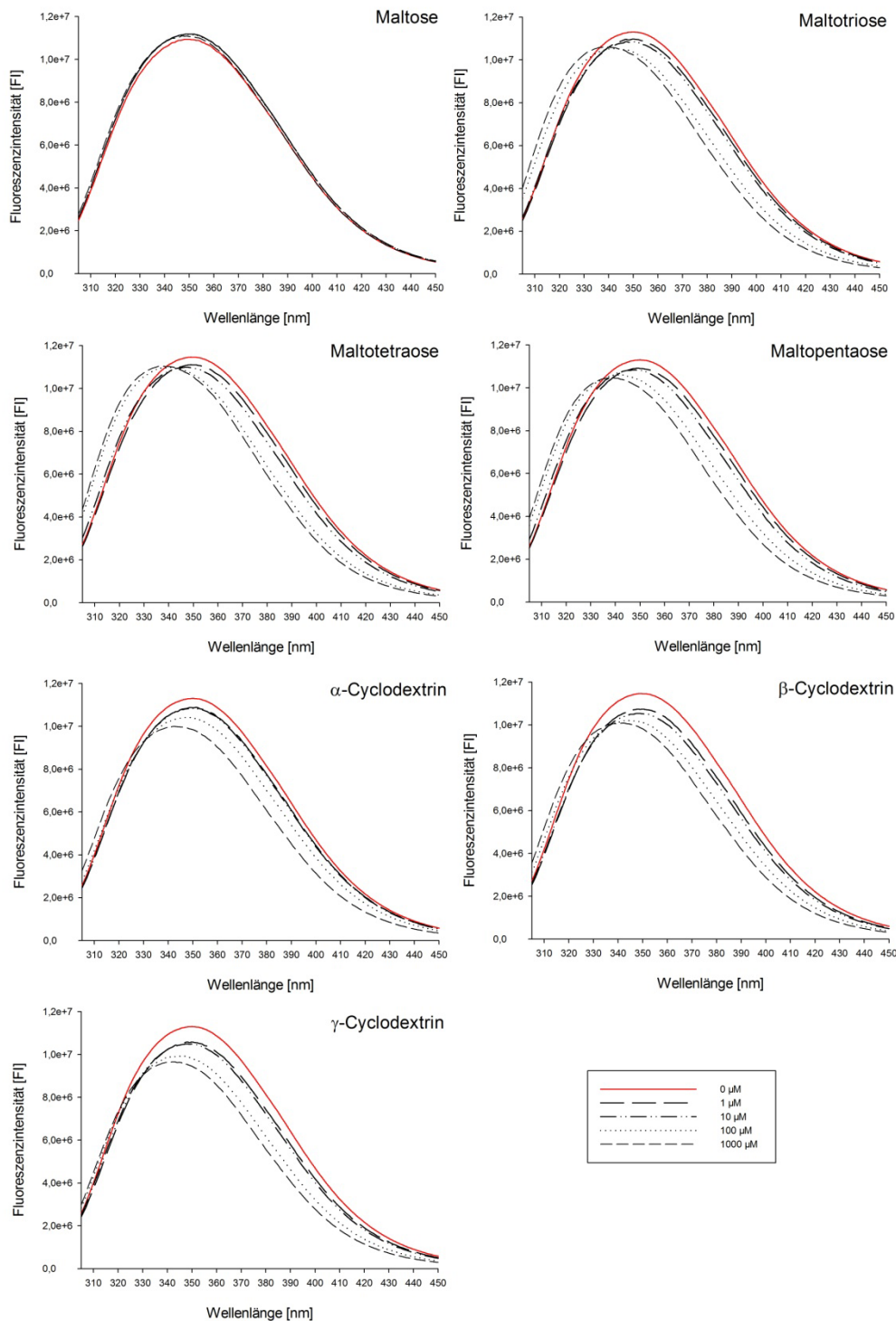
Um funktionelle Defekte von MalE1( $\Delta$ 1-35) ausschließen zu können und zu überprüfen, ob mit einer linkerregionenthaltenden MalE1-Variante bessere Dissoziationskonstanten bestimmt werden können, wurden Kontrollmessungen in Anwesenheit von MalE1( $\Delta$ 1-22<sub>C23A</sub>) durchgeführt (Abbildung 8 H). Die Bindung von Maltotetraose resultierte in einer nur zweifach besseren Bindungskonstante ( $K_d$   $26 \pm 0,2 \mu\text{M}$ , nicht dargestellt) und war damit vergleichbar zu MalE1( $\Delta$ 1-35).

**Tabelle 2: Thermodynamische Parameter aus den ITC-Messungen von MalE1( $\Delta$ 1-35).** \*  $\pm$  Fehler beziehen sich auf Fehler aus dem Fit von Daten aus zwei individuellen Experimenten ausgewertet nach dem *one-site binding model*.

	$K_d, \mu\text{M}^*$	$\Delta G, \text{kcal/mol}$	$\Delta H, \text{kcal/mol}^*$	$-T\Delta S, \text{kcal/mol}$ bei 20 °C	n *
<b>Maltose</b>	NB	NB	NB	NB	NB
<b>Maltotriose</b>	$48 \pm 2$	-5,8	$2,65 \pm 0,03$	-8,4	$0,97 \pm 0,009$
<b>Maltotetraose</b>	$48 \pm 1$	-5,8	$4,4 \pm 0,3$	-10,2	$1,08 \pm 0,05$
<b>Maltopentaose</b>	$55 \pm 1$	-5,7	$4 \pm 0,02$	-9,8	$1,18 \pm 0,004$
<b><math>\alpha</math>-Cyclodextrin</b>	$143 \pm 6$	-5,2	$0,56 \pm 0,02$	-5,7	$1,05 \pm 0,02$
<b><math>\beta</math>-Cyclodextrin</b>	$38 \pm 0,4$	-5,9	$0,76 \pm 0,03$	-6,7	$0,99 \pm 0,03$
<b><math>\gamma</math>-Cyclodextrin</b>	$49 \pm 1$	-5,8	$-4,3 \pm 0,05$	-10,1	$1,08 \pm 0,009$

### 2.1.3 Substratbindungstests über Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie diente als ein alternatives Verfahren, um die zuvor bestimmten Bindungskonstanten von MalE1 für die linearen und zyklischen Zucker sowie die fehlende Affinität zu Maltose über eine sensitivere Methode zu bestimmen (4.4.3). Das Bindeprotein MalE1 enthält sechs Tryptophanreste, welche über die gesamte Proteinsequenz verteilt auftreten. In Anwesenheit von bis zu 1 mM Maltose konnte keine Veränderung der Tryptophanfluoreszenz von MalE1 beobachtet werden (Abbildung 9). Diese fehlende Bindung bestätigte die Ergebnisse der isothermalen Titrationskalorimetrie (Abbildung 8 A). Die Komplexbildung von MalE1 mit allen weiteren linearen und zyklischen Maltodextrinen resultierte in einer Blauverschiebung des Emissionsmaximums um bis zu 13 nm, wohingegen die Bindung der zyklischen Zucker zusätzlich eine signifikante Verminderung der Fluoreszenzintensität auslöste (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Veränderungen des MalE1-Fluoreszenzverhaltens als Konsequenz der Ligandenbindung.** Dargestellt sind die Fluoreszenzemissionsspektren aus Messungen von jeweils 2  $\mu\text{M}$  MalE1 in Anwesenheit von 9 bis 15 verschiedenen Konzentrationen an linearen und zyklischen Zuckern (0,1 bis 1000  $\mu\text{M}$ , im Fall von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Cyclodextrin bis 2 mM). Die Emissionsspektren wurden zwischen 305 bis 450 nm, bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm, in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) bei 21°C aufgenommen. Der Einfachheit halber sind jeweils die Spektren von vier verschiedenen Konzentrationen (1, 10, 100 und 1000  $\mu\text{M}$ ) der Zucker dargestellt.

Die berechneten Dissoziationskonstanten (Tabelle 3) lagen alle im vergleichbaren Bereich zu den über die isothermale Titrationskalorimetrie bestimmten Werten (Tabelle 2). Die schlechteste Affinität hatte das Bindeprotein zu dem zyklischen Zucker  $\alpha$ -Cyclodextrin, wohingegen die höchste Affinität zu Maltotetraose bestimmt wurde.

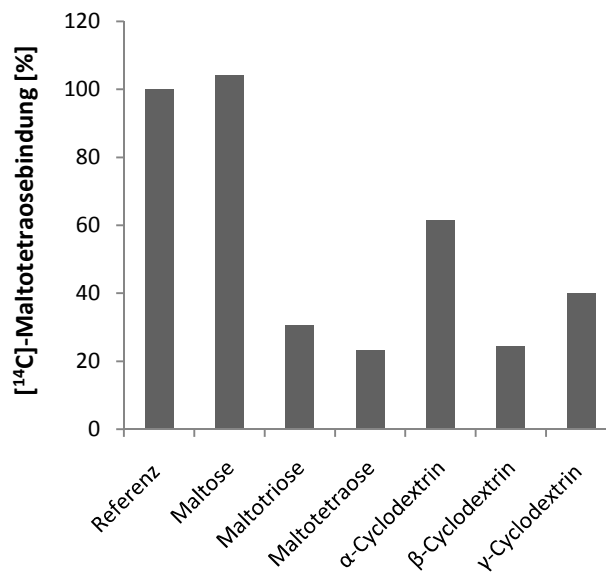
**Tabelle 3: Über die Fluoreszenzspektroskopie bestimmte Dissoziationskonstanten von MalE1 für Maltose, lineare Maltodextrine und Cyclodextrine.** Berechnungen basieren auf 9 bis 15 Zugaben von jedem Zucker im Bereich zwischen 0,1  $\mu$ M und 1 mM (bis 2 mM im Fall von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Cyclodextrin). Die Werte basieren auf zwei unabhängigen Messungen mit angegebenen Standardabweichungen.  $[F]^a$ , Fluoreszenzänderungen, Daten basieren auf Blauverschiebung des Emissionsmaximums;  $[F]^b$ , Fluoreszenzänderungen, Daten basieren auf Verminderung der Fluoreszenzintensität; NB, keine Bindung; ND, nicht bestimmt

	$K_d$ ( $\mu$ M) $[F]^a$	$K_d$ ( $\mu$ M) $[F]^b$
<b>Maltose</b>	NB	NB
<b>Maltotriose</b>	$43 \pm 12$	ND
<b>Maltotetraose</b>	$27 \pm 4$	ND
<b>Maltopentaose</b>	$46 \pm 9$	ND
<b><math>\alpha</math>-Cyclodextrin</b>	$172 \pm 33$	$136 \pm 14$
<b><math>\beta</math>-Cyclodextrin</b>	$78 \pm 15$	$41 \pm 6$
<b><math>\gamma</math>-Cyclodextrin</b>	$38 \pm 9$	$72 \pm 4$

#### 2.1.4 Bindungstests mit radioaktiv markierten Substraten

Zur abschließenden Kontrolle wurde MalE1 in einem Präzipitationsexperiment zunächst bezüglich seiner Affinität zu  $[^{14}\text{C}]$ -Maltose und  $[^{14}\text{C}]$ -Maltotetraose nach dem Protokoll von Richarme & Kepes (1983) untersucht (4.3.21). Dabei konnte eindeutig eine Bindung von Maltotetraose durch MalE1 mit einer Dissoziationskonstante von 10  $\mu$ M bestimmt werden. Im Gegensatz dazu wurde keine Bindung von Maltose nachgewiesen.

In weiterführenden Kompetitionsstudien (4.3.21) wurde MalE1( $\Delta$ 1-35) mit linearen oder zyklischen Zuckern versetzt und Reaktionen durch Zugabe der zur Konkurrenz erforderlichen  $[^{14}\text{C}]$ -Maltotetraose gestartet. Der ermittelte Anteil an gebundener  $[^{14}\text{C}]$ -Maltotetraose wurde nachfolgend als prozentualer Vergleich in einem Balkendiagramm dargestellt (Abbildung 10). Da diese Messung nur einmal durchgeführt und trotz eines 200fachen Überschusses von Maltotetraose eine 20 %ige  $[^{14}\text{C}]$ -Maltotetraosebindung an MalE1 detektiert wurde, diente sie lediglich zur Kontrolle der zuvor bestimmten Substratpräferenzen von MalE1. Genaue Affinitäten waren nicht zu bestimmen. Wie in Abbildung 10 zu erkennen, konnte die an MalE1 gebundene radioaktiv markierte Maltotetraose nicht durch einen Überschuss an kalter Maltose verdrängt werden. Damit wurde ebenfalls über diese Methode die fehlende Affinität von MalE1 zu Maltose bestätigt. Die schlechteste Affinität des Bindeproteins wurde zu  $\alpha$ -Cyclodextrin bestimmt.



**Abbildung 10: Konkurrenz der [<sup>14</sup>C]-Maltotetraosebindung an MalE1 in Gegenwart linearer und zyklischer Zucker.** Zur Bestimmung des Substratspektrums wurden 50 μM MalE1(Δ1-35) zunächst für eine Minute mit den zu testenden Zuckern in einer Konzentration von jeweils 10 mM inkubiert, um dann letztendlich 50 μM [<sup>14</sup>C]-Maltotetraose hinzuzugeben. Der ermittelte Anteil an gebundener [<sup>14</sup>C]-Maltotetraose wurde prozentual aufgetragen. Die Ergebnisse basieren auf einer Einfachmessung. In Anwesenheit von kalter Maltose konnte die [<sup>14</sup>C]-Maltotetraose nicht ersetzt werden. Im Gegensatz dazu wurde durch einen Überschuss an Maltotetraose, nur noch eine 20 %ige [<sup>14</sup>C]-Maltotetraosebindung detektiert.

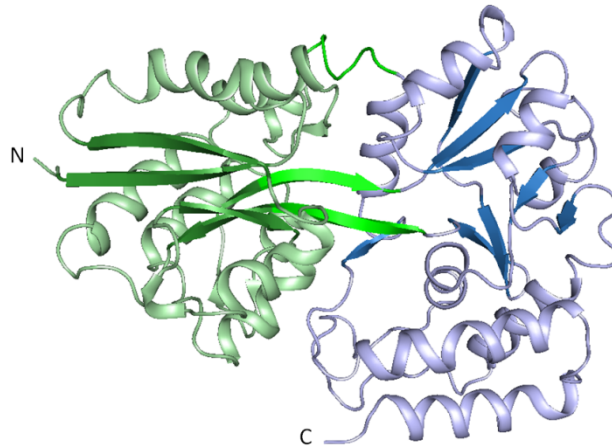
Zusammenfassend identifizieren die durchgeführten Bindungstests MalE1 als Maltodextrinbindeprotein mit vergleichbaren Affinitäten zu linearen und zyklischen Zuckern.

### 2.1.5 Kristallisation von MalE1

Zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur und zur Aufdeckung der Gründe warum MalE1 keine Affinität zu Maltose hat, wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Strukturbiologie/Biochemie (Humboldt-Universität zu Berlin) durch Dr. Bommer Kristallisationsexperimente von MalE1 durchgeführt (4.4.1). Die Auflösung der Kristallstrukturen erfolgte mittels röntgendiffraktometrischen Strukturanalysen an der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY). Die Nummerierung der Reste innerhalb der Kristallstrukturen basiert auf der Sequenz des reifen Bindeproteins, welches mit einem Cystein beginnt.

Von MalE1 wurden einerseits dreidimensionale Strukturen im Komplex mit Maltotriose (PDB: 5M28), Maltotetraose (PDB: 5MTT) bzw. α- (PDB: 5MTU), β- (PDB: 5MK9) und γ- (PDB: 5MKA) Cyclodextrin in Auflösungen von 0,92 bis 1,15 Å bestimmt und andererseits eine substratfreie Struktur (PDB: 5MKB) mit einer Auflösung von 1,7 Å (Abbildung 11, Tabelle 9 und 10 im Anhang). In Anwesenheit von 100 bis 200 mM Maltose wurden keine maltosegebundenen, sondern leere oder maltotriosegebundene Kristalle isoliert. Maltotriose ist mit ≤ 1 % ein Bestandteil der käuflich erworbenen Maltose und wurde als

Verunreinigung gebunden. Damit bestätigten die Kristallisationsexperimente ebenfalls die fehlende Affinität von MalE1 zu Maltose. Die Überlagerung der geschlossenen ligandierten Strukturen resultierte in einer hohen Übereinstimmung, sichtbar durch einen kleinen *rmsd* von 0,12 Å für die C<sub>α</sub>-Atome. Dahingegen ergab die Überlagerung der geöffneten leeren mit der maltotriosegebundenen MalE1-Struktur eine *rmsd* von 0,37 Å.



**Abbildung 11: Dreidimensionale Struktur von MalE1 (PDB: 5MKB).** Das globuläre Cluster B/Klasse I Bindeprotein besteht aus einer N- (grün) und C- (blau) terminalen Domäne. Beide Domänen setzen sich aus einem  $\beta$ -Faltblatt aus fünf  $\beta$ -Strängen (jeweils farblich hervorgehoben) zusammen, welches von  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Eine Verbindung wird über eine *hinge*-Region aus 2  $\beta$ -Strängen der N-terminalen Domäne und einer kurzen Schleife geformt (hellgrün). Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMol erstellt. N, N-Terminus; C, C-Terminus.

MalE1 kann aufgrund seiner Struktur den Cluster B/Klasse I SBPs zugeordnet werden (Fukami-Kobayashi *et al.*, 1999; Berntsson *et al.*, 2010; Scheepers *et al.*, 2016). Das globuläre Protein setzt sich aus einer N-terminalen (Reste 15 bis 127, 270 bis 323) und einer C-terminalen Domäne (Reste 128 bis 269, 327 bis 386) zusammen (Abbildung 11). Jede Domäne besteht aus einem zentralen fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblatt, welches von mehreren  $\alpha$ -Helices umgeben wird. Die flexible *hinge*-Region wird aus zwei zentralen  $\beta$ -Strängen der N-terminalen Domäne (*interdomain linker*) sowie einer kurzen Schleife geformt und umschließt die in einem Spalt zwischen ihnen befindliche Substratbindetasche.

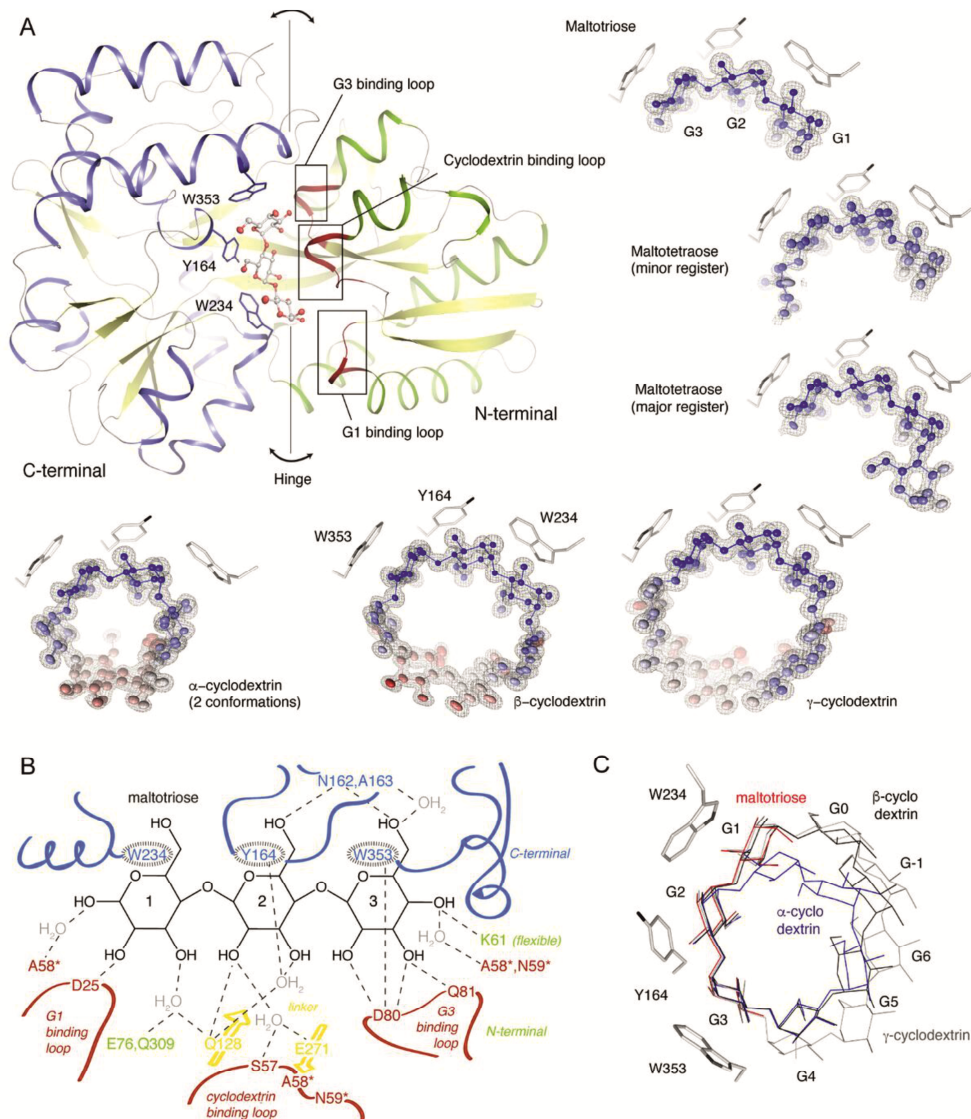
Das kürzeste Substrat Maltotriose wird über die in der C-terminalen Domäne lokalisierten aromatischen Reste W234, Y164 und W353 gebunden. Zusätzlich interagiert das Substrat mit dem *interdomain linker* und die Glucoseeinheiten G1 und G3 hauptsächlich mit den innerhalb der N-terminalen Domäne lokalisierten G1- (D25 bis Q28) und G3- (A78 bis Q81) Bindschleifen (Abbildung 12 B). Wasserstoffbrücken werden einerseits zwischen dem ersten Glucosering und der G1-Bindschleife sowie dem *interdomain linker* gebildet und andererseits zwischen dem zweiten Zuckerring und der C-terminalen Domäne, dem *linker* sowie der Cyclodextrinbindeschleife (S53 bis N59). Auffällig werden deutlich mehr Wasserstoffbrücken von der N-terminalen Domäne zum Substrat ausgebildet (Abbildung 12 B). Maltotriose wird über acht potenzielle direkte Wasserstoffbrücken gebunden und

zusätzlich über sechs indirekte von an dem Protein gebundenen Wassermolekülen. Die längsten Abstände für Wasserstoffbrückenbindungen (2,4 bis 3,2 Å) wurden zwischen dem dritten Glucosering und Q81 sowie D80 innerhalb der G3-Bindeschleife, als auch dem flexiblen K61 innerhalb der N-terminalen Domäne bestimmt. Das konservierte D80 interagiert über Wasserstoffbrücken mit zwei Hydroxylgruppen des dritten Glucoserings als auch mit W353, sodass eine Verbindung zum Substrat und zwischen der N- und C-terminalen Domäne des Proteins geschaffen wird. Dieser verlinkende Rest stabilisiert die geschlossene Form des SBP's (Tschapek *et al.*, 2011).

Maltotetraose kann an MalE1 in zwei unterschiedlichen Konformationen binden. Entweder ragt der zusätzliche Zuckerring am reduzierenden Ende des ersten Glucoserings heraus oder, eher seltener vorkommend, am nichtreduzierenden Ende der G3-Einheit (Abbildung 12 A). Der Glucoseüberhang am G1 wird durch die Reste T26, N55 und A58 von der G1- und Cyclodextrinbindeschleife stabilisiert, nimmt aber eine Position quer zur Fläche von G1 bis G3 ein. Diese Rotation konnte nicht bei der Bindung der Cyclodextrine festgestellt werden. Der Zuckerring der am G3 herausragt wird hingegen durch die Reste A58 und N59 der Cyclodextrinbindeschleife stabilisiert. Für eine effektive Bindung des Substrats muss sich das flexible K61 wegbewegen.

Die verwendeten zyklischen Zucker nehmen größtenteils die gleichen Positionen innerhalb der Bindetasche wie die linearen Zucker ein. Sie sitzen wie eine Krone auf der in der N-terminalen Domäne befindlichen Cyclodextrinbindeschleife. Die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu einigen zusätzlichen Resten (T26, S53, N55, A58 und N59) stabilisiert die Cyclodextrinbindung. Darüber hinaus sind die flexiblen Seitenketten von N59, K61 und N354 an der Bindung der größeren Liganden beteiligt. In Anwesenheit aller getesteten zyklischen Zucker wurde eine geschlossene Konformation des MalE1 erhalten. Das aus sechs Glucoseeinheiten bestehende  $\alpha$ -Cyclodextrin kann in zwei Konformationen an MalE1 binden. Grund dafür ist der durch die Krümmung bestehende Kontakt mit nur zwei der aromatischen Reste der C-terminalen Domäne von MalE1 (Abbildung 12 A) und die daraus resultierende schlechte Affinität zu diesem zyklischen Zucker. Die hochaufgelöste  $\beta$ -Cyclodextringebundene Struktur unterschied sich, je nach isoliertem Kristall, in einer Verschiebung der zu dem aromatischen Rest W234 führenden Helix.





**Abbildung 12: (A) Details der Substratbindung dargestellt in der Kristallstruktur von MalE1.** Die drei aromatischen Reste W234, Y164 und W353 der C-terminalen Domäne von MalE1 binden einen Abschnitt von drei Glucoseeinheiten des Substrats (G1, G2 und G3). Innerhalb der N-terminalen Domäne interagieren zwei Schleifen hauptsächlich mit den Glucoseeinheiten G1 und G3, wohingegen eine dritte Schleife einen „Sattel“ für die Bindung der Cyclodextrine bildet. Gebundene Substrate wurden aus der Perspektive der N-terminalen Domäne dargestellt. Ellipsoide repräsentieren B-Faktoren, welche anisotrop verfeinert wurden (Blau, fest definierte Atomposition und Rot, flexible Atomposition), wohingegen die Form der Ellipsoide die Richtung und das Ausmaß der Atomabstände wiedergeben. Durch schwarze Gitternetze wird die  $2F_o - F_c$  Elektronendichte bei  $1,2 \sigma$  dargestellt. Maltotetraose wurde in zwei unterschiedlichen Konformationen gebunden. **(B) Schematische Darstellung der Bindetasche in Anwesenheit von Maltotriose.** Die C-terminale Domäne (oben) wurde in blau und die N-terminale in grün, mit roten interagierenden Schleifen (unten) und dem *interdomain linker* in gelb (Pfeile repräsentieren  $\beta$ -Stränge) dargestellt. Potenzielle Wasserstoffbrückenbindungen zu Seitenketten oder über Wassermoleküle wurden in gestrichelten Linien dargestellt. **(C) Überlagerung von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin auf die maltotriosegebundene MalE1-Struktur.** Abbildung aus Homburg *et al.*, 2017, erstellt durch Dr. Bommer.

Zusammenfassend sind die aromatischen Reste W234, Y164 und W353 der C-terminalen Domäne von MalE1 an der Bindung von drei Glucoseringen (G1 bis G3) des Substrats



beteiligt (Abbildung 12 A). Der geschlossene Zustand des Bindeproteins wird zusätzlich durch Wasserstoffbrücken von der N- und C-terminalen Domäne zum Substrat stabilisiert (Abbildung 12 B). Innerhalb der N-terminalen Domäne interagieren die G1- sowie die G3-Bindeschleifen hauptsächlich mit dem ersten und dritten Zuckerring des gebundenen Substrats. Eine dritte Schleife ist für die Bindung der Cyclodextrine notwendig (Abbildung 12 A). Bei allen Liganden, die länger als Maltotriose sind, hängen die zusätzlichen Glucoseeinheiten aus der Bindetasche heraus. Die bestimmten hohen und anisotrop verfeinerten B-Faktoren der Zuckerringe verdeutlichten die hohe räumliche Flexibilität von diesen Überhängen (Abbildung 12 A).

## 2.2 Funktionelle Charakterisierung von MalE1-MalF1G1K1<sub>2</sub>

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die untersuchten Substrate über MalF1G1K1<sub>2</sub> transportiert werden. Dafür musste in einem ersten Schritt der Transporter heterolog in *E. coli* überproduziert werden, um ihn dann in eine Lipidumgebung einzubringen und auf seine Aktivität zu untersuchen.

### 2.2.1 Überproduktion und Reinigung von MalF1G1K1<sub>2</sub> aus einem *E. coli*-Wirtstamm

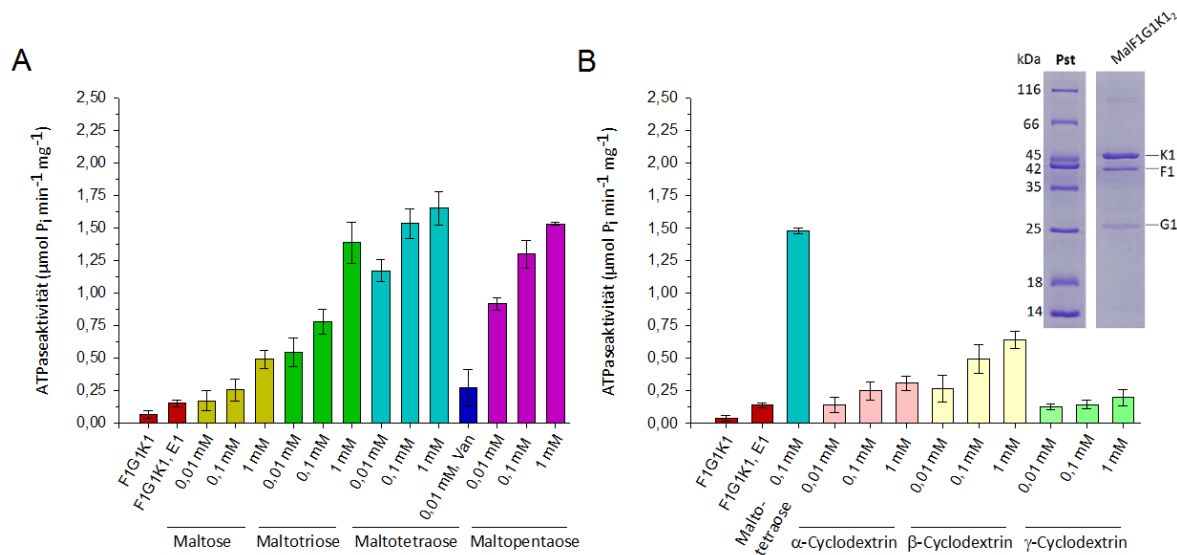
Die Überproduktion des Transportkomplexes erfolgte in *E. coli* BL21 T1 DE3 (4.2.5), transformiert mit den Plasmiden pFSA125 und pCH10. Nach Aufschluss der Zellen und anschließendem Herauslösen des Transportkomplexes aus der Membran, konnte dieser über den an MalK1 befindlichen 10 x His-Tag an einer Talonmatrix gereinigt werden (4.3.3). Die an MalK1 assoziierten Membrankomponenten MalF1G1 wurden kogereinigt und die ermittelte Proteinausbeute betrug durchschnittlich 0,5 mg je Liter Zellkultur. Im SDS-Gel wurde der Transportkomplex in MalK1 (mit His-Tag 45 kDa), MalF1 (50 kDa) und MalG1 (32 kDa) aufgetrennt. Wie bereits für andere polytopische Membranproteine bekannt, zeigten MalF1G1 ein von ihren molaren Massen unterschiedenes Laufverhalten (MalF1 bei 42 kDa und MalG1 bei rund 25 kDa) (Abbildung 13 B Insert).

### 2.2.2 Funktionelle Rekonstitution und Nachweis der ATPaseaktivität

Ein isolierter ABC-Importer weist i.d.R. in Abwesenheit eines substratbeladenen Bindeproteins lediglich eine basale ATPaseaktivität auf. Diese wird durch Bindung eines ligandierten Bindeproteins an den Transporter stimuliert und ist ein Hinweis für dessen Transportaktivität (Davidson *et al.*, 1992).

Um den isolierten ABC-Importer MalF1G1K1<sub>2</sub> in Bezug auf seine Aktivität zu untersuchen, wurde dieser zuerst in eine Lipidumgebung gebracht. Der Einbau erfolgte sowohl in kugelförmige Liposomen (4.3.12) als auch in scheibenförmige Nanodiscs (4.3.13). Die ATPaseaktivität des Transporters wurde wie unter 4.3.14 beschrieben bestimmt. Der in Liposomen eingebaute MalF1G1K1<sub>2</sub>-Komplex zeigte in Anwesenheit von substratfreiem MalE1 eine geringe Basalaktivität ( $0,15 \pm 0,03 \mu\text{mol Phosphat min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ). In Anwesenheit von 1 mM Maltotetraose konnte diese 11fach stimuliert werden und resultierte in einer

spezifischen Aktivität von  $1,65 \pm 0,1 \mu\text{mol Phosphat min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  (Abbildung 13 A). Durch Bindung der linearen Zucker Maltotriose und Maltopentaose wurden etwas geringere Aktivitäten von  $1,38 \pm 0,2 \mu\text{mol Phosphat min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  und  $1,5 \pm 0,01 \mu\text{mol Phosphat min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  bestimmt. Die zyklischen Zucker stimulierten den Transporter deutlich geringer. In Anwesenheit von 1 mM  $\beta$ -Cyclodextrin wurde MalF1G1K1<sub>2</sub> 4fach und durch Bindung von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin 2fach stimuliert (Abbildung 13 B).



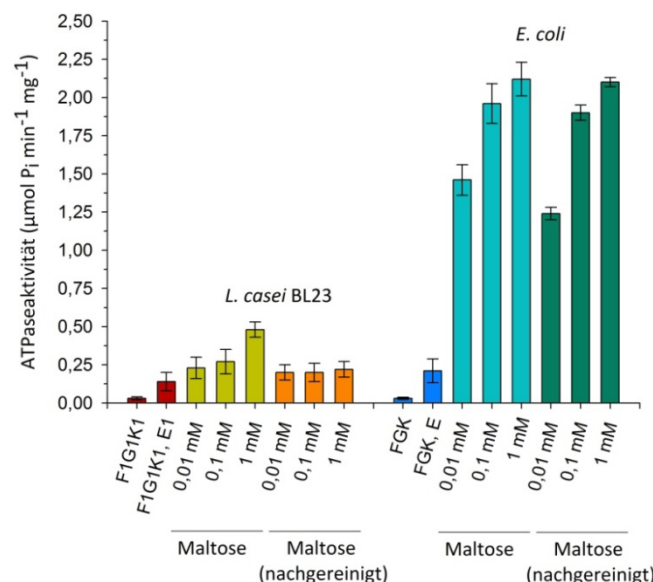
**Abbildung 13: Stimulation der ATPaseaktivität des in Liposomen eingebauten Transportkomplexes in Anwesenheit linearer (A) und zyklischer (B) Zucker.** Der in Liposomen eingebaute Transportkomplex ( $0,5 \mu\text{M}$ ) wurde in Anwesenheit von MalE1 ( $6,8 \mu\text{M}$ ) und der angegebenen Menge an Zucker vermessen. **(A)** MalF1G1K1<sub>2</sub> hatte eine geringe Basalaktivität, die am stärksten in Anwesenheit von 1 mM Maltotetraose stimuliert wurde (11fach). Die Bindung und der Transport von Maltotriose und Maltopentaose resultierten in einer etwas geringeren ATPaseaktivität. Durch Zugabe von 1 mM Maltose wurde in etwa die gleiche Aktivität wie in Anwesenheit von  $10 \mu\text{M}$  Maltotriose erzielt. In Anwesenheit von Orthovanadat (Van) wurde eine deutliche Reduktion der Aktivität bestimmt. **(B)** In Bezug auf die zyklischen Zucker wurde eine 4fache Stimulierung der ATPaseaktivität in Anwesenheit von  $\beta$ -Cyclodextrin bestimmt, wohingegen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin den Transporter 2fach stimulierten. Die Daten beruhen auf drei unabhängigen Experimenten. Insert: SDS-PAGE des gereinigten Transportkomplexes,  $2 \mu\text{g}$  wurden auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen und die Banden bei 45 kDa MalK1, 42 kDa MalF1 und 25 kDa MalG1 zugeordnet. Spur 1: Pst, Proteinstandard, Spur 2:  $2 \mu\text{g}$  MalF1G1K1<sub>2</sub>.

Zusätzlich wurde die Inhibierung der MalE1/Maltotetraose stimulierten ATPaseaktivität durch Orthovanadat untersucht (4.3.16). In Anwesenheit dieser chemischen Verbindung wurde die stimulierte Aktivität nahezu auf die Basalaktivität reduziert ( $0,2 \pm 0,14 \mu\text{mol Phosphat min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) (Abbildung 13 A). Diese Reduktion ist durch die Blockade der ADP-Freisetzung nach einem Schritt der ATP-Hydrolyse zu erklären und der damit verbundenen Fixierung des Transporters in der *outward-facing* Konformation (Oldham & Chen, 2011 b). Die durch Maltotetraose ausgelöste Stimulation der Aktivität des in Nanodisc eingebauten Transporters lag bei  $2,1 \pm 0,4 \mu\text{mol Phosphat min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  und war damit durch die beidseitige Erreichbarkeit leicht erhöht (Abbildung 19).

In Anwesenheit von 0,1 und 1 mM Maltose wurde eine bis zu 4fache Stimulierung der ATPaseaktivität bestimmt (Abbildung 13 A). Dieses Ergebnis war so nicht zu erwarten, da über die verschiedenen Bindungsstudien von MalE1 keine Affinität zu Maltose bestimmt wurde (Abbildung 8 A, 9 und 10). Nach näherer Betrachtung der Aktivitäten war die Stimulation in Anwesenheit von 1 mM Maltose ( $0,49 \pm 0,07 \mu\text{mol Phosphat min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) vergleichbar zu der von 10  $\mu\text{M}$  Maltotriose ( $0,54 \pm 0,1 \mu\text{mol Phosphat min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ). Zusätzlich wurden, wie bereits erwähnt (2.1.5), in Anwesenheit von Maltose maltotriosegebundene Kristalle erhalten. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die in der käuflich erworbenen Maltose (Sigma-Aldrich, 63418) enthaltene Verunreinigung durch Maltotriose ( $\leq 1\%$ ) möglicherweise die 4fache Stimulierung hervorrief. Das gleiche wurde auch bei anderen untersuchten Maltodextrinbindeproteinen aus *Pyrococcus furiosus* (Evdokimov *et al.*, 2001) und *T. thermophilus* (Cuneo *et al.*, 2009) vermutet, die wie MalE1 eine geringe oder keine Affinität zu Maltose aufweisen. Aktivitätsmessungen des Transporters in Abwesenheit von MalE1 und von bis zu 100 mM Maltose bestätigten zusätzlich, dass Maltose nicht unabhängig von einem Bindeprotein aufgenommen werden kann (Daten nicht gezeigt).

### 2.2.3 Veränderung der ATPaseaktivität in Anwesenheit nachgereinigter Maltose

Um zu überprüfen, ob tatsächlich die stimulierte Aktivität von der Maltotrioseverunreinigung ( $\leq 1\%$  Maltotriose) stammt, wurde im Folgenden die kommerziell erworbene Maltose (100 % reine Maltose kann käuflich nicht erworben werden) über eine Papierchromatographie nachgereinigt (4.3.20).

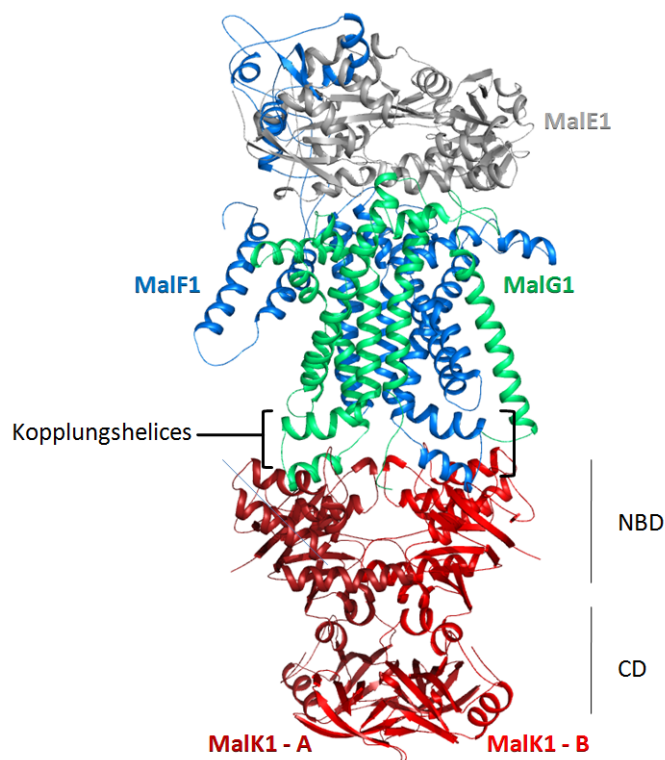


**Abbildung 14: Überprüfung der ATPaseaktivitäten von in Liposomen eingebauten ABC-Importern aus *L. casei* BL23 (links) und *E. coli* (rechts) in Anwesenheit einer über Papierchromatographie nachgereinigten Maltose.** 0,5  $\mu\text{M}$  eingebauter Transportkomplex wurden in Anwesenheit von 6,8  $\mu\text{M}$  MalE1 und der entsprechenden Menge an Zucker vermessen. Durch Zugabe von bis zu 1 mM nachgereinigter Maltose konnte der MalF1G1K1<sub>2</sub>-Transporter aus *L. casei* BL23 nicht stimuliert werden. Im Gegensatz dazu wurde der Maltose/Maltodextrin ABC-Importer aus *E. coli* 10fach stimuliert, sowohl in Anwesenheit der käuflich erworbenen als auch der nachgereinigten Maltose. Die Daten beruhen auf drei unabhängigen Experimenten.

Aktivitätsmessungen in Anwesenheit von bis zu 1 mM der nachgereinigten Maltose resultierten in keiner Stimulierung von MalF1G1K1<sub>2</sub> ( $0,2 \pm 0,06 \mu\text{mol Phosphat min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , Abbildung 14 links). Im Gegensatz dazu zeigte der als Kontrolle dienende gereinigte homologe *E. coli* Maltose/Maltodextrin ABC-Importer eine deutliche Zunahme der ATPaseaktivität ( $2,1 \pm 0,03 \mu\text{mol Phosphat min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , Abbildung 14 rechts). Die über diesen Versuch erhaltenen Ergebnisse unterstützen die bis hierhin erworbenen Erkenntnisse, dass Maltose nicht über MalE1 an den Transporter übermittelt wird.

#### 2.2.4 Strukturmodell des Transporters

Für die folgenden Studien in Bezug auf die Regulation des MalF1G1K1<sub>2</sub>-Komplexes wurde zunächst ein Strukturmodell des Transporters erstellt. In einem ersten Schritt wurden dafür von MalF1, MalG1 und MalK1 über Homologien Strukturmodelle via I-TASSER (Yang *et al.*, 2015) berechnet. MalF1 und MalG1 hatten dabei die höchsten Übereinstimmungen mit den beiden TMDs des Maltose/Maltodextrin ABC-Importers aus *E. coli* (PDB: 2R6G; Oldham *et al.*, 2007). MalK1 wies hingegen eine höhere Übereinstimmung mit der NBD des Alginate ABC-Importers AlgM1M2SS aus *Sphingomonas* sp. A1 auf (PDB: 4TQU; Maruyama *et al.*, 2015).



**Abbildung 15: Strukturmodell von MalF1G1K1<sub>2</sub> komplexiert mit MalE1.** Die einzelnen Untereinheiten wurden mit I-TASSER (Yang *et al.*, 2015) modelliert und in PyMol zu einem Strukturmodell des gesamten Transporters zusammengesetzt. Als Matrize diente die Kristallstruktur des *E. coli* Maltose/Maltodextrin ABC-Importers (PDB: 2R6G). Die MalK1-Untereinheiten (A und B) wurden rot, MalF1 blau, MalG1 grün und MalE1 (PDB: 5MKB) grau dargestellt. Zusätzlich sind die Kopplungshelices von MalF1 und MalG1, die N-terminalen Nukleotidbindedomänen (NBD) und die C-terminalen Domänen (CD) der MalK1-Untereinheiten markiert.

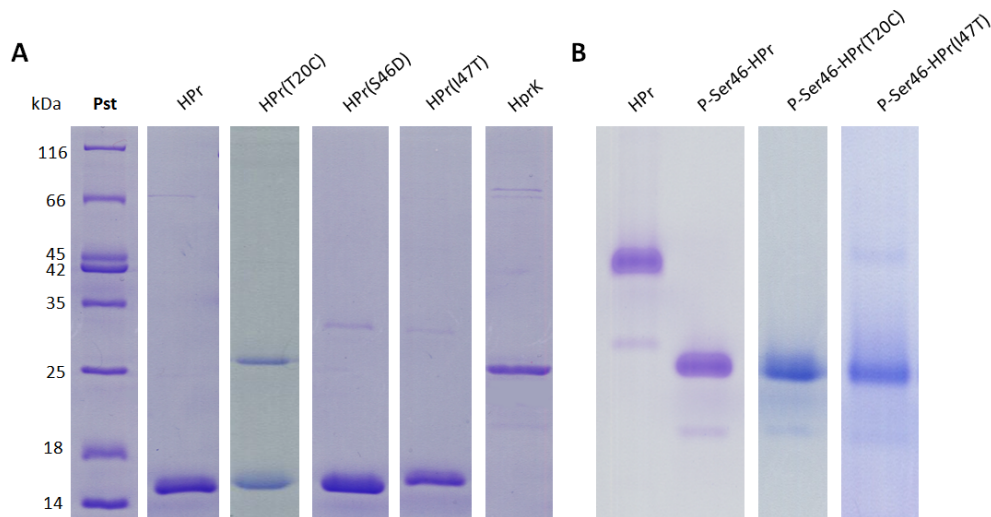
Die erhaltenen Modelle sowie die Struktur des offenen MalE1 (PDB: 5MKB) wurden im Anschluss in PyMol mit der Struktur des *E. coli* Transporters im katalytischen Intermediat (PDB: 2R6G) abgeglichen. Das so erhaltene Strukturmodell des MalE1-MalF1G1K1<sub>2</sub>-Komplexes wies *rmsd*'s der C $\alpha$ -Atome von 0,4 Å für MalG1, 2,9 Å für MalF1, 4,5 Å für MalK1 und 2 Å für MalE1 auf. In dem in Abbildung 15 dargestellten Modell wurde in MalF1 eine 118 Aminosäuren lange zweite extracytoplasmatische Schleife identifiziert, die außerhalb der Zelle mit MalE1 interagiert. Ein über den TMHMM Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) erstelltes Topologiemodell von MalF1 identifizierte hingegen keine besonders großen extracytoplasmatischen Schleifen (Abbildung 33 im Anhang). Laut dem TMHMM-Modell weisen die vier außerhalb der Membran gelegenen Schleifen ungefähre Längen von 34 bis 45 Aminosäuren auf. Das Bindeprotein MalE1 interagiert über die N-terminale Domäne mit MalF1 und über die C-terminale mit MalG1. Ebenfalls deutlich zu erkennen, sind die Kopplungshelices von MalF1 und MalG1 zu, die eine Verbindung zu den ATPasen schaffen. Ein MalK1-Monomer besteht aus einer N-terminalen Nukleotidbindedomäne und einer C-terminalen Domäne. Die N-terminale Domäne setzt sich wiederum aus der RecA-ähnlichen und  $\alpha$ -helikalen Subdomäne zusammen.

## 2.3 Regulation des Mal1-Systems über P-Ser46-HPr

Nachdem im letzten Abschnitt die Funktionalität des gereinigten Transporters bestätigt wurde, sollte im Folgenden über *in vitro* Inhibierungsexperimente die Rolle von P-Ser46-HPr beim Induktorausschluss geklärt werden.

### 2.3.1 Isolation und Phosphorylierung verschiedener HPr-Varianten

Die Überproduktion von HPr und der im Nachfolgenden verwendeten Varianten HPr(T20C), HPr(S46D) und HPr(I47T) erfolgte in *E. coli* BL21 DE3 Fit in Anwesenheit der Plasmide pET-ptsH, pCH12, pWS32 bzw. ptsH3 (4.2.5). Nach Aufschluss der Zellen und Reinigung der Proteine (4.3.4) lagen die ermittelten Proteinausbeuten im Durchschnitt für HPr bei 40 mg, HPr(T20C) bei 10 mg und HPr(S46D) sowie HPr(I47T) bei 1 mg. Der Reinheitsgrad der Proteine wurde über eine SDS-PAGE untersucht (Abbildung 16 A). Die Auftragung von HPr(T20C) resultierte nicht nur in einer Bande bei rund 15 kDa, sondern zusätzlich in einer bei rund 28 kDa. Ein immunologischer Nachweis ( $\alpha$ -HPr *B. subtilis*) bestätigte die Anwesenheit eines HPr(T20C)-Dimers, welches durch Zugabe von DTT reduziert werden konnte (nicht gezeigt). Ebenfalls wurden bei den anderen HPr-Varianten in weitaus geringeren Mengen multimere Formen gefunden. Außerdem wurde eine  $\Delta$ HprK/P<sub>R245A</sub> (keine Phosphorylasefunktion) isoliert, die *in vitro* Phosphorylierungen in Anwesenheit von ATP ermöglichte (Chaptal *et al.*, 2007). Diese Kinase (HprK) wurde in *E. coli* NM522 überproduziert (4.2.5), die Zellen aufgeschlossen und aus der cytosolischen Fraktion über eine Nickel-NTA-Affinitätschromatographie mit einer Proteinausbeute von 2,4 mg pro Liter Kultur isoliert (4.3.5, Abbildung 16 A).



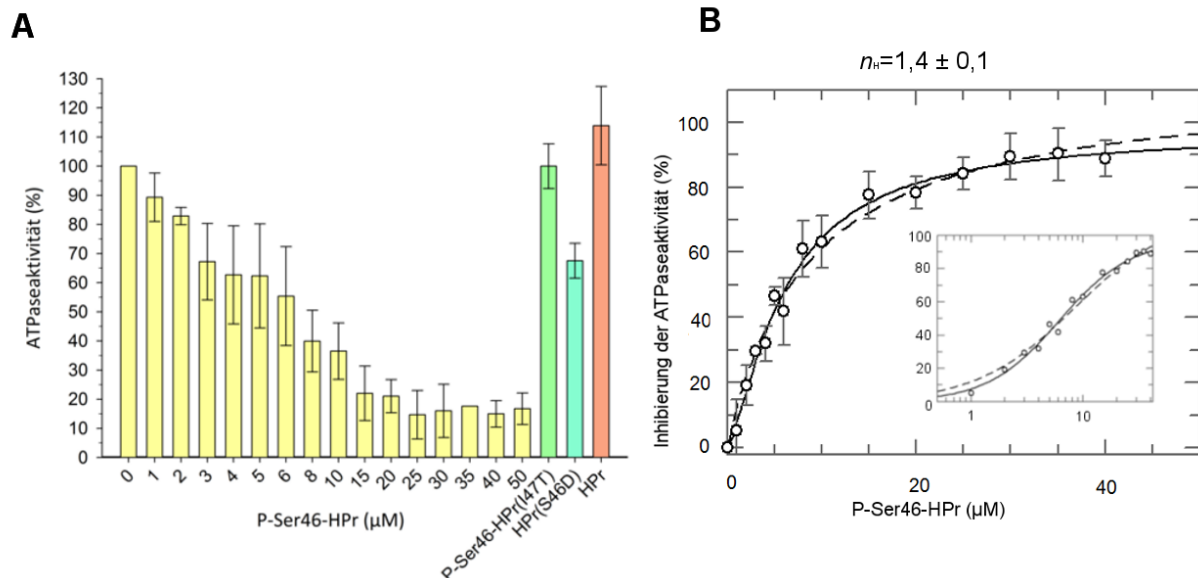
**Abbildung 16: (A) SDS-Gel der isolierten HPr-Varianten sowie der HprK.** Die Proteine wurden in einer Konzentration von 2 µg auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen. HPr war bei rund 15 kDa und die HPr Kinase (HprK) bei 25 kDa sichtbar. In der HPr(T20C)-Probe war zusätzlich eine Bande bei rund 25 kDa sichtbar (Dimer von HPr(T20C)). In HPr(S46D) und HPr(I47T) waren ebenfalls in geringen Mengen multimere Formen zu erkennen. Spur 1: Pst, Proteinstandard, Spur 2: HPr, Spur 3: HPr(T20C) und HPr(T20C)<sub>2</sub>, Spur 4: HPr(S46D), Spur 5: HPr(I47T), Spur 6: HprK. **(B) Gel nach einer nicht-denaturierenden Elektrophorese.** Dargestellt ist ein 12,5 %iges natives Gel der phosphorylierten Proteine P-Ser46-HPr (Spur 2), P-Ser46-HPr(T20C) (Spur 3) und P-Ser46-HPr(I47T) (Spur 4) im Vergleich zum HPr (Spur 1). Eine erfolgreiche Phosphorylierung wurde durch eine Verschiebung der Bande sichtbar.

Die Proteine HPr, HPr(T20C) und HPr(I47T) wurden anschließend ATP-abhängig durch die isolierte HprK phosphoryliert (4.3.11). Der Erfolg der Phosphorylierung wurde durch Elektrophorese unter nativen Bedingungen überprüft (4.3.9) und resultierte bei allen Varianten in einer Mobilitätsveränderung der Proteine, sichtbar durch eine Verschiebung der Bande (Abbildung 16 B).

### 2.3.2 Einfluss verschiedener HPr-Varianten auf die ATPaseaktivität des Transporters

Im Folgenden wurden ATPaseaktivitäten von MalF1G1K1<sub>2</sub> in Anwesenheit verschiedener HPr-Varianten bestimmt (4.3.15). Die MalE1/Maltotetraose stimulierte ATPaseaktivität des Transporters wurde nur durch das phosphorylierte HPr inhibiert und bestätigte damit erstmals *in vitro* eine Interaktion von P-Ser46-HPr mit dem ABC-Importer. In Abbildung 17 A ist die ATPaseaktivität als Funktion der P-Ser46-HPr Konzentration dargestellt. In Anwesenheit von 25 µM P-Ser46-HPr wurde die stimulierte Aktivität um 85 % gehemmt, wohingegen durch Zugabe von etwa 7 µM Inhibitor eine 50 %ige Inhibierung der ATPaseaktivität erzielt wurde. Damit lag P-Ser46-HPr im 14fachen molaren Überschuss gegenüber 0,5 µM Transportkomplex vor. Die Analyse der Daten über die Hill-Gleichung (GraFit) resultierte in einen Koeffizienten von  $1,4 \pm 0,1$  (Abbildung 17 B). Während der Regulation über den Induktorausschluss binden demnach mehr als ein Protein an den Transporter. In Anwesenheit von HPr wurde eine zusätzliche Stimulierung der Aktivität um

durchschnittlich 10 % bestimmt. Durch eine Erhitzung des Proteins auf 90°C (wie bei der Fällung der HprK, 4.3.11) wurde dieser stimulierende Effekt nicht aufgehoben.



**Abbildung 17: (A) Inhibition der MalE1/Maltotetraose stimulierten ATPaseaktivität des Transporters in Anwesenheit zunehmender Konzentrationen an P-Ser46-HPr und verschiedener HPr-Varianten.** Die Zugabe von 10 μM Maltotetraose zum MalF1G1K1<sub>2</sub>-E1-System resultierte in einer stimulierten Aktivität von  $1,7 \pm 0,3 \mu\text{mol Phosphat min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  (100 %). Die maximale Inhibition wurde in Anwesenheit von 25 μM P-Ser46-HPr bestimmt, die Zugabe von HPr (30 μM) bewirkte hingegen eine 10 %ige Stimulation der Aktivität. Die Mutante HPr(S46D) löste eine 30 %ige Inhibition aus und in Anwesenheit von 30 μM P-Ser46-HPr(I47T) wurde sie gänzlich aufgehoben. Die Standardabweichungen beruhen auf drei unabhängigen Messungen. **(B)** Auswertung der Daten von A) über die Hill-Gleichung resultierte in einen Hill-Koeffizienten ( $n_H$ ) von  $1,4 \pm 0,1$  und spricht damit für eine positive Kooperativität.

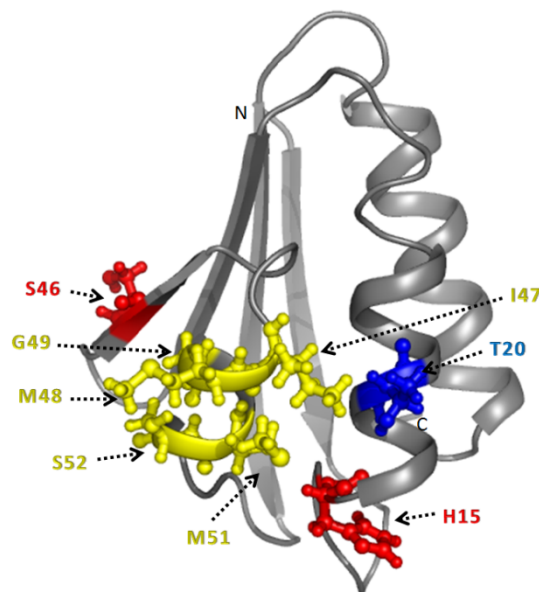
Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener HPr-Varianten auf die stimulierte ATPaseaktivität untersucht. Die HPr-Mutante S46D imitiert den phosphorylierten Zustand des Proteins (Deutscher *et al.*, 1994). Wie in Abbildung 17 A zu erkennen, inhibierte das gereinigte Protein die MalE1/Maltotetraose stimulierte Aktivität um 30 % und damit deutlich geringer als das phosphorylierte Wildtypprotein. Aktivitätsmessungen bei einem basischen pH-Wert von 8,0 und 8,5 sollten die Dissoziation des Protons von der zusätzlichen Carboxylgruppe des Asp-Restes begünstigen. Die Aktivität des Transporters nahm jedoch unter diesen basischen Bedingungen drastisch ab (pH 8,0) bis hin zur fehlenden Stimulation (pH 8,5), sodass der Einfluss von HPr(S46D) auf die ATPaseaktivität des Transporters nicht weiter bestimmt werden konnte (Daten nicht gezeigt). In Anwesenheit von phosphoryliertem HPr(I47T) wurde die Inhibition von MalF1G1K1<sub>2</sub> aufgehoben (Abbildung 17 A) und resultierte in einer stimulierten Aktivität vergleichbar zu der ohne Inhibitor. Damit wurden die *in vivo* Versuche bestätigt (Gauthier *et al.*, 1997).



### 2.3.3 Identifizierung der mit P-Ser46-HPr interagierenden Einheit des Transporters

Basierend auf den bisherigen Daten zur Inhibierung, einer hohen Aminosäuresequenzübereinstimmung der ATPasen aus *E. coli* und *L. casei* BL23 sowie in Analogie zum Inhibierungsmechanismus des *E. coli* Maltose/Maltodextrin ABC-Importers durch EIIA<sup>Glc</sup> (Bao & Duong, 2013; Chen *et al.*, 2013; Wuttge *et al.*, 2016) wäre eine Interaktion von P-Ser46-HPr mit den NBDs möglich. Zur Überprüfung der Hypothese wurden Quervernetzungsversuche in Anwesenheit des heterobifunktionalen Quervernetzers Benzophenon-4-Maleimid (BPM) durchgeführt (4.3.18).

Um einen geeigneten Rest in HPr zu finden der nach Substitution zu einem Cystein nicht die Interaktion beeinflusst, aber gleichzeitig Quervernetzungen ermöglicht, war es notwendig ein Strukturmodell des *L. casei* BL23 HPr zu erstellen. Dafür wurde über Homologien ein Modell via I-TASSER (Yang *et al.*, 2015) berechnet und mit der dreidimensionalen Struktur des HPr aus *E. faecalis* (88 % Sequenzübereinstimmung; PDB: 1FU0; Audette *et al.*, 2000) abgeglichen. Dabei ergab sich eine hohe Übereinstimmung der Strukturen mit einer *rmsd* von 0,4 Å für die C<sub>α</sub>-Atome. Wie in Abbildung 18 zu erkennen, setzt sich das *L. casei* BL23 HPr aus einem viersträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt zusammen, dem zwei lange und eine kurze  $\alpha$ -Helix aufgelagert sind.

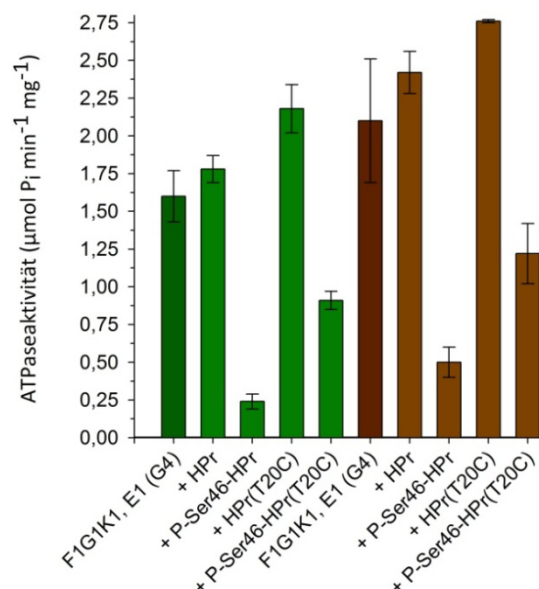


**Abbildung 18: Darstellung eines Strukturmodells von HPr aus *L. casei* BL23.** HPr wurde mit I-TASSER (Yang *et al.*, 2015) modelliert und über PyMol mit HPr aus *E. faecalis* (PDB: 1FU0) abgeglichen. Die beiden Proteine haben eine 88 %ige Sequenzübereinstimmung. Die zu phosphorylierenden Reste His15 und Ser46 sind rot dargestellt. Weitere Reste die für Interaktionen mit der bifunktionalen HprK/P (Met48, Gly49, Ser52) sowie CcpA, EI, verschiedenen EIAs oder nicht-PTS-Permeasen (hydrophobe Bereich aus Ile47, Met48, Met51) relevant sind, wurden gelb hervorgehoben. Thr20 wurde blau dargestellt und die einzelnen Reste als Kugel-Stab-Modell dargestellt. N, N-Terminus; C, C-Terminus

Anhand dieses Modells wurde das Thr20 als vielversprechender Rest für Quervernetzungsversuche ausgewählt. Dieser Rest liegt auf der gleichen Oberfläche, aber



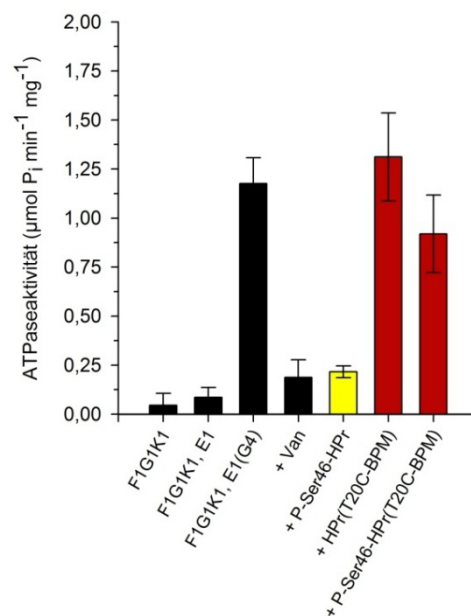
außerhalb des für die Interaktion mit nicht-PTS-Permeasen erforderlichen hydrophoben Bereichs. Nach Austausch des Thr20 zu einem Cystein (4.1.2) und folgender Isolation der Mutante (2.3.1) wurde diese erfolgreich ATP-abhängig durch die HprK phosphoryliert (Abbildung 16 B). Anschließend wurden Aktivitätsmessungen des in Liposomen oder Nanodisc eingebauten Transporters in Anwesenheit der Mutante durchgeführt. Wie in Abbildung 19 zu erkennen, waren die ATPaseaktivitäten des in Nanodisc rekonstituierten Transporters gegenüber dem in Liposomen eingebauten erhöht. Die Zugabe von HPr resultierte in einer 10 %igen bzw. HPr(T20C) in einer 36 %igen Stimulierung der ATPaseaktivität von MalF1G1K1<sub>2</sub>. In Anwesenheit von P-Ser46-HPr(T20C) wurde der Transporter um 50 % inhibiert. Die Mutation bewirkte demnach eine ca. 30 % schwächere Hemmung gegenüber P-Ser46-HPr.



**Abbildung 19: MalE1/Maltotetraose stimulierte ATPaseaktivität von MalF1G1K1<sub>2</sub> in Ab- oder Anwesenheit von 30 µM HPr, P-Ser46-HPr, HPr(T20C) und P-Ser46-HPr(T20C).** Die ATPaseaktivitäten des in Liposomen (grün) und in Nanodisc (braun) eingebauten Transportkomplexes sind dargestellt. Die MalE1/Maltotetraose abhängige stimulierte Aktivität des in Nanodisc eingebauten Transporters war gegenüber der in Proteoliposomen bestimmten erhöht (dunkle Balken). Die stimulierte Aktivität wurde in Anwesenheit von HPr um 10 % und HPr(T20C) um 36 % erhöht. Die Zugabe von P-Ser46-HPr(T20C) resultierte in einer durchschnittlichen Inhibierung von 50 % (P-Ser46-HPr rund 80 %). Die Standardabweichungen beruhen auf drei unabhängigen Messungen. G4, Maltotetraose

Da die Substitution keine Aufhebung der Inhibierung zur Folge hatte und der Rest die Interaktion mit P-Ser46-HPr nur leicht zu stören scheint, wurde die Mutante für nachfolgende Quervernetzungsversuche verwendet. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Carolin Hobe im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt (Hobe, 2016). Dafür wurde P-Ser46-HPr(T20C) über unterschiedliche Zeitperioden von 30 und 60 Minuten, als auch über Nacht im Dunkeln mit BPM markiert (4.3.18). Um die Effizienz dieser

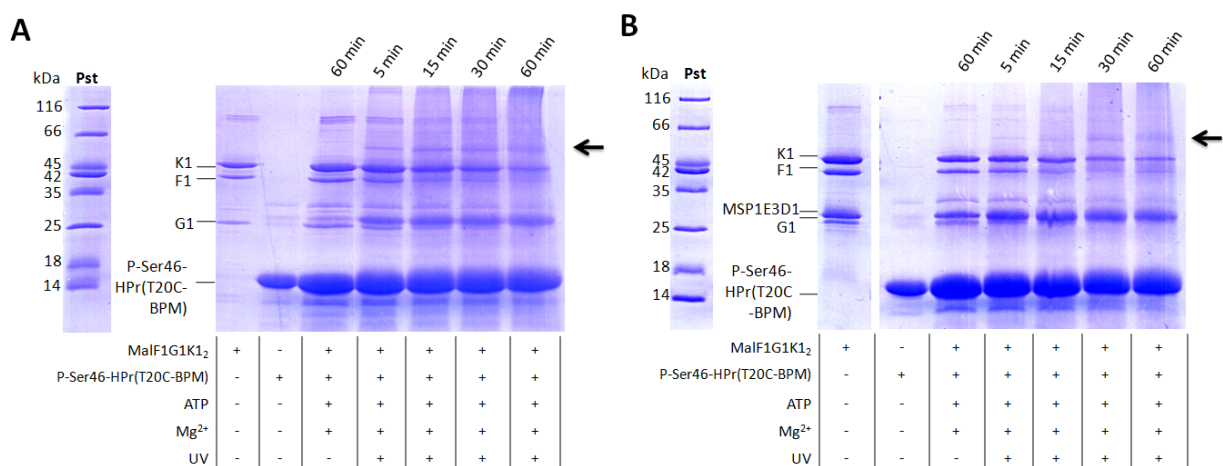
Markierung zu überprüfen, wurden die gereinigten Ansätze anschließend mit dem Fluorophor 2-(4'-Maleimidylanilino)-Naphthalene-6-Sulfonsäure (MIANS) markiert. Dabei reagierte die Maleimidgruppe von MIANS mit den Thiolgruppen des Proteins. Eine Kontrollmarkierung des BPM-freien P-Ser46-HPr(T20C) resultierte in einer stark fluoreszierenden Bande. Bereits nach einer 30-minütigen Inkubation von P-Ser46-HPr(T20C) mit BPM war der Erfolg der Markierung durch eine fehlende fluoreszierende Bande festzustellen (Abbildung 34 im Anhang). Anschließend wurden Aktivitätsmessungen in Anwesenheit des markierten Proteins durchgeführt. Die MalE1/Maltotetraose stimulierte Aktivität des in Liposomen eingebrachten Transporters ( $1,2 \pm 0,13 \mu\text{mol Phosphat min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ) wurde in Anwesenheit von HPr(T20C-BPM) um 11 % stimuliert und in Anwesenheit von P-Ser46-HPr(T20C-BPM) um 22 % inhibiert (Abbildung 20). Damit scheint die Markierung des Inhibitors einen Einfluss auf die Inhibierung des Transporters zu haben.



**Abbildung 20: MalE1/Maltotetraose stimulierte ATPaseaktivität des in Liposomen eingebauten Transporters in Ab- oder Anwesenheit von BPM-markiertem HPr(T20C) bzw. P-Ser46-HPr(T20C).** In Anwesenheit von  $40 \mu\text{M}$  P-Ser46-HPr wurde eine 81 %ige Inhibierung der ATPaseaktivität von MalF1G1K1<sub>2</sub> bestimmt (gelber Balken). Die ATPaseaktivität des MalE1/Maltotetraose stimulierten Transporters war in Anwesenheit von  $40 \mu\text{M}$  HPr(T20C-BPM) um 11 % erhöht und in Anwesenheit von P-Ser46-HPr(T20C-BPM) um rund 20 % inhibiert (rote Balken). In Anwesenheit von  $0,5 \text{ mM}$  Orthovanadat wurde eine 85 %ige Inhibierung erzielt. MBB, MTS-BP-Bio; Van, Orthovanadat

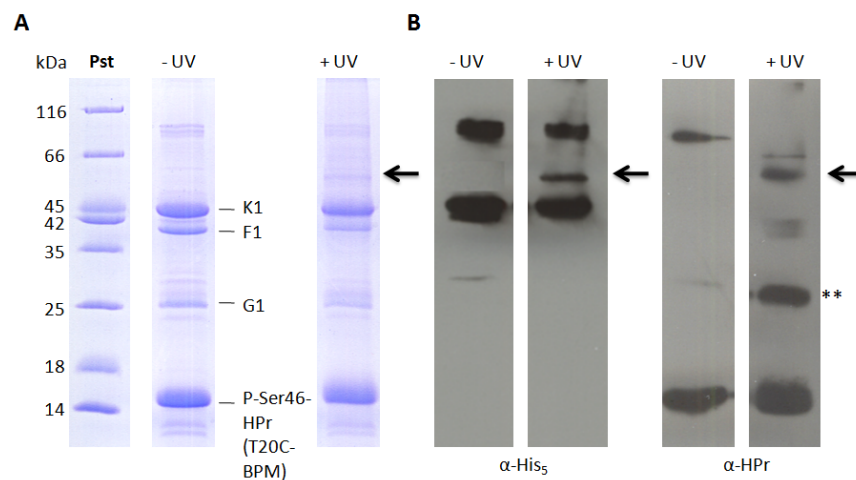
Die folgenden Quervernetzungsreaktionen von P-Ser46-HPr(T20C-BPM) mit dem in Lösung befindlichen Transporter wurden durch eine Bestrahlung bei  $302 \text{ nm}$  gestartet und die Ansätze über eine SDS-PAGE analysiert (Abbildung 21 A). Da die tatsächlich interagierende Konformation des Transporters nicht bekannt war, wurden den Ansätzen ATP/Mg<sup>2+</sup> zugesetzt. Bereits nach einer fünfminütigen Bestrahlung war eine zusätzliche Bande von rund  $60 \text{ kDa}$  Größe (MalK1:  $42,5 \text{ kDa}$ , HPr:  $9,3 \text{ kDa}$ ) sichtbar. Im Gegensatz dazu war bei

einem nicht bestrahlten Kontrollansatz nach einer 60-minütigen Inkubation keine zusätzliche Bande zu erkennen. Aufgrund einer fehlenden ATPaseaktivität des MalF1G1K1<sub>2</sub>-Transporters in Detergenzmizellen musste ausgeschlossen werden, dass das erhaltene Vernetzungsprodukt nicht künstlich erzeugt wurde. Zu diesem Zweck erfolgten zusätzlich Quervernetzungsreaktionen von P-Ser46-HPr(T20C-BPM) mit dem in Nanodisc eingebauten Transporter (ATP/Mg<sup>2+</sup>). Diese resultierten ebenfalls, wenn auch etwas abgeschwächt, in einer bei 60 kDa laufenden Quervernetzungsbande (Abbildung 21 B). Quervernetzungsreaktionen in Anwesenheit des unphosphorylierten Proteins resultierten ebenfalls in einer Bande bei 60 kDa (Daten nicht gezeigt). Zur genauen Analyse der quervernetzten Proteine wurden die Banden bei 60 kDa ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut (4.3.19) und durch Dr. Beck (Arbeitsgruppe Analytische Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin) einer Massenspektrometrie unterzogen (4.4.4). Durch Vergleich der erhaltenen Peptide aus der quervernetzten Probe mit denen der gereinigten Proteine (MalK1, MalF1, MalG1 und HPr(T20C)) konnte die zusätzliche Bande eindeutig MalK1 als Interaktionspartner zu P-Ser46-HPr(T20C) zugeordnet werden (Tabelle 11 im Anhang). Alle massenspektrometrischen Signale der tryptischen Peptide in MalK1 (21 Peptide, 66 % Sequenzübereinstimmung mit dem His-Tag Protein) wurden ebenfalls in der Quervernetzungsbande detektiert – einschließlich der Mehrheit der HPr-Signale (36 % Sequenzübereinstimmung mit dem His-Tag Protein). Für MalF1 wurden nur zwei und für MalG1 keine Signale innerhalb des Quervernetzungsprodukts ermittelt, die mit den Massen der tryptischen Peptide übereinstimmten. Obwohl zusätzliche Quervernetzungen zu MalF1G1 nicht vollständig ausgeschlossen werden konnten, demonstrieren die Vielzahl an detektierten Peptiden innerhalb des Quervernetzungsprodukts eine bevorzugte Interaktion von P-Ser46-HPr(T20C) mit MalK1.



**Abbildung 21: Quervernetzungsversuche von MalF1G1K1<sub>2</sub> mit BPM-markiertem P-Ser46-HPr(T20C) in Detergenzlösung (A) oder in Nanodiscs (B).** 2,5 µM Komplexprotein wurden mit 200 µM P-Ser46-HPr(T20C-BPM) und in Anwesenheit der aufgeführten Kofaktoren bei 302 nm für 5, 15, 30 und 60 Minuten bestrahlt. Nach Analyse der Proben über eine SDS-PAGE (15 %) wurde die zusätzliche Quervernetzungsbande bei rund 60 kDa (Pfeil) über eine massenspektrometrische Analyse MalK1 und P-Ser46-HPr zugeordnet. BPM, Benzophenon-4-Maleimid; MSP1E3D1, *membrane scaffold protein*; Pst, Proteinstandard

Um die Interaktion von Malk1 mit P-Ser46-HPr(T20C) über eine andere Methode zu bestätigen, wurden Immunoblot-Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Quervernetzungsversuche unter den zuvor bestimmten optimierten Bedingungen (4.3.18) in Anwesenheit von His-Tag freiem P-Ser46-HPr(T20C-BPM) wiederholt und ein Western-Blot angefertigt. Die erhaltenen Immunoblots wurden anschließend mit Antiseren gegen einen His<sub>5</sub>-Tag und HPr aus *B. subtilis* behandelt. Durch Nachweis von Malk1, mit seinem N-terminal fusionierten His<sub>10</sub>-Tag, und P-Ser46-HPr(T20C-BPM) innerhalb der Quervernetzungsbande (Abbildung 22) wurden die Ergebnisse der Massenspektrometrie bestätigt.

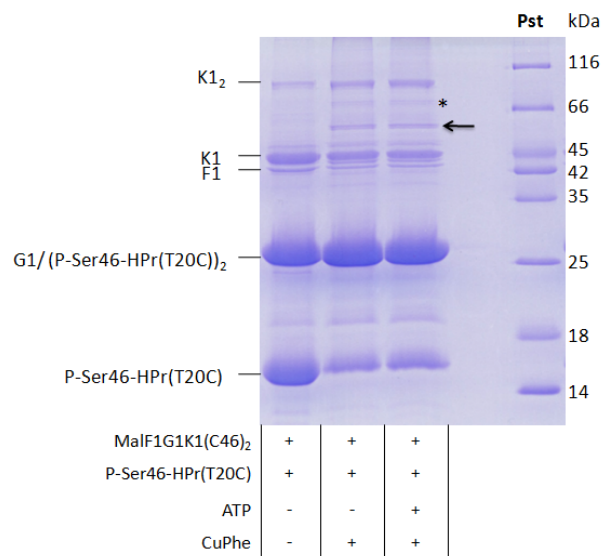


**Abbildung 22: Identifikation des Quervernetzungsprodukts über Immunoblotting.** In Liposomen rekonstituierter Komplex (2,5 µM) sowie His-Tag freies P-Ser46-HPr(T20C-BPM) (200 µM) wurden bei 302 nm (+ UV) für 15 Minuten bestrahlt oder für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert (- UV). Die Ansätze wurden auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen (A) und weiter über Immunoblotting analysiert (B). Immunoblots wurden mit Antiseren gegen HPr aus *B. subtilis* und α-His<sub>5</sub>-Tag, welches den N-terminalen His<sub>10</sub>-Tag von Malk1 detektiert, behandelt. Innerhalb des Quervernetzungsprodukts (Pfeil) bei rund 60 kDa konnten beide Proteine, Malk1 und P-Ser46-HPr(T20C-BPM), nachgewiesen werden. \*\* kennzeichnet ein Dimer von P-Ser46-HPr(T20C)

#### 2.3.4 Analyse der Kontaktstelle von P-Ser46-HPr innerhalb von Malk1

Da es über die Massenspektrometrie nicht gelang quervernetzte Peptide zu identifizieren, sollte im Folgenden die Kontaktstelle innerhalb von Malk1 näher untersucht werden. Es bestand die Hypothese, dass die Quervernetzungsstelle innerhalb des Malk1-abgeleiteten Peptids <sup>36</sup>EFIVFVGPSGCGK<sup>48</sup> (Nummerierung entsprechend der Primärstruktur von Malk1 und übereinstimmend mit den Resten 56-68 in der Tabelle 11 im Anhang) liegt. Dieses Peptid war im Vergleich zur Malk1-Kontrolle das einzige, welches in der quervernetzten Probe nicht bestimmt wurde. Interessanterweise setzte sich das Peptid größtenteils aus Resten des zur ATP-Bindung erforderlichen Walker A-Motivs zusammen (unterstrichen) und enthielt zusätzlich das einzige Cystein innerhalb von Malk1 (doppelt unterstrichen).

Folglich wurde MalF1G1K1(C46)<sub>2</sub> mit P-Ser46-HPr(T20C) in Anwesenheit vom Quervernetzer Kupferphenanthrolin (CuPhe) inkubiert (4.3.18). Dieser ermöglichte bei Bildung von Disulfidbindungen, entweder nahe gelegener oder bei einer Reaktion in unmittelbarer Nähe kommender Cysteine, eine Quervernetzung in Anwesenheit von Sauerstoff. Dabei definiert sich der maximal vernetzbare Abstand (zwischen 10 und 30 Å) vor allem durch die Flexibilität der zu vernetzenden Reste zueinander (Miller *et al.*, 2003). In dem im Abschnitt 2.3.6 dargestellten Modell (Abbildung 28) wurde der Bereich von E36 bis K48 hervorgehoben (türkis) und der Abstand zwischen HPr(T20C) und MalK1(C46) auf 15 Å berechnet. Wie in Abbildung 23 zu erkennen, wurde sowohl in An- als auch Abwesenheit von ATP ebenfalls eine bei rund 60 kDa laufende Quervernetzungsbande von gleicher Intensität detektiert. Eine zusätzliche Quervernetzungsbande bei rund 80 kDa wurde ebenfalls ermittelt, aufgrund der unpassenden molekularen Masse aber nicht weiter untersucht. Eine massenspektrometrische Analyse der trypsinverdauten Quervernetzungsbande bei rund 60 kDa bestätigten die Anwesenheit von MalK1 und HPr(T20C) (Abbildung 35 im Anhang). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass P-Ser46-HPr in der Nähe (10 bis 30 Å) des Walker A-Motivs von MalK1 bindet und so den Transporter in seiner Aktivität inhibiert.



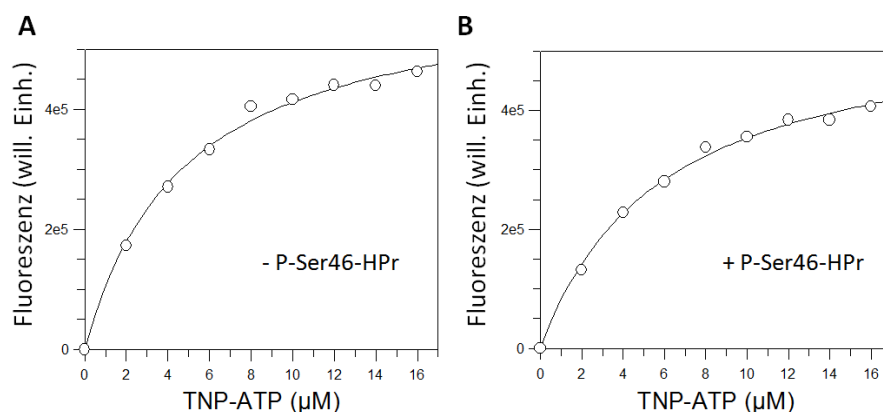
**Abbildung 23: Quervernetzungsversuche von P-Ser46-HPr(T20C) mit MalF1G1K1(C46)<sub>2</sub> in Anwesenheit von CuPhe.** 1 µM MalF1G1K1(C46)<sub>2</sub> wurde in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 mit 80 µM P-Ser46-HPr(T20C) und 3 mM CuPhe in An- oder Abwesenheit von 2 mM ATP für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 mM N-Ethylmaleimid gestoppt und über eine SDS-PAGE analysiert. Die entstandene Quervernetzungsbande bei rund 60 kDa (Pfeil) wurde massenspektrometrisch analysiert und konnte erneut den beiden Proteinen MalK1 und P-Ser46-HPr(T20C) zugeordnet werden. \* markiert eine weitere Quervernetzungsbande die aufgrund ihrer unpassenden molekularen Masse nicht weiter analysiert wurde. MalG1 und ein Dimer von P-Ser46-HPr(T20C) laufen auf gleicher Höhe bei rund 25 kDa. Pst, Proteinstandard

### 2.3.5 Einfluss der P-Ser46-HPr-/MalK1-Interaktion auf die Nukleotidbindung

Im Gegensatz zur Inhibierung des *E. coli* Maltose-/Maltodextrintransporters durch unphosphoryliertes EIIA<sup>Glc</sup> wird das Mal1-System aus *L. casei* BL23 hingegen nur durch am

Serin46 phosphoryliertes HPr gehemmt. Während einer Inhibierung könnte demnach die Phosphorylgruppe direkt die  $\gamma$ -Phosphatbindestelle des ATP im MalK1-Dimer blockieren und damit eine ATP-Bindung verhindern oder, genauso wie Vanadat, nach einem Schritt der ATP-Hydrolyse die ADP-Freisetzung blockieren. Um das zu überprüfen, wurden mithilfe des ATP-Analogons 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)Adenosin 5'-Triphosphat (TNP-ATP) ATP-Bindungsstudien von MalF1G1K1<sub>2</sub> in An- oder Abwesenheit des Regulators P-Ser46-HPr durchgeführt (4.4.3).

Zu diesem Zweck wurde der Transporter in Nanodiscs eingebaut und mit TNP-ATP in Anwesenheit von Maltotetraose/MalE1 titriert (Abbildung 24). Für die Bindung des ATP-Analogons ergab sich eine Dissoziationskonstante von  $4,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$ . Bei Konzentrationen von P-Ser46-HPr die eine rund 90 %ige Inhibierung der ATPaseaktivität des Transporters auslösten, wurde ein  $K_d$  von  $5,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$  bestimmt. Damit wurde keine signifikante Änderung in der Bindung von TNP-ATP ermittelt und lässt auf eine unbeeinflusste Nukleotidbindung während der P-Ser46-HPr-/MalK1-Interaktion schließen.



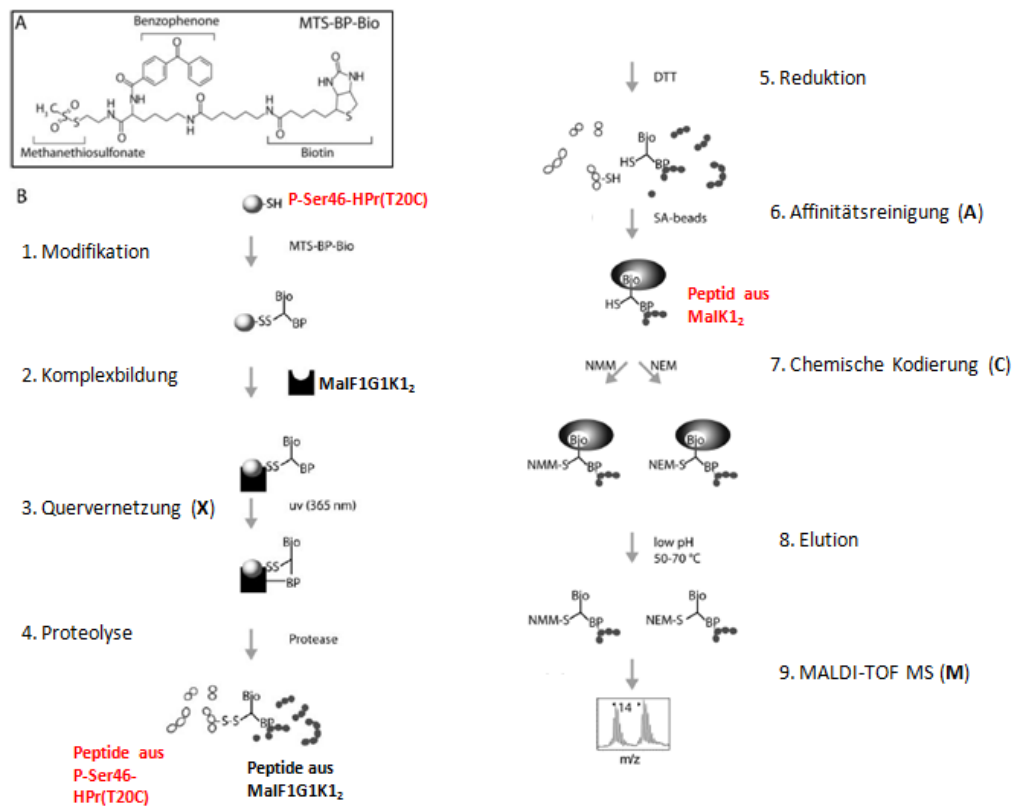
**Abbildung 24: Gleichgewichtstitration von MalF1G1K1<sub>2</sub> mit TNP-ATP.** Der in Nanodisc eingebaute Komplex (0,5  $\mu\text{M}$ ) wurde 3 Minuten bei Raumtemperatur in Anwesenheit von 6,8  $\mu\text{M}$  MalE1, 10  $\mu\text{M}$  Maltotetraose und in Ab- (A) oder Anwesenheit (B) von 40  $\mu\text{M}$  P-Ser46-HPr mit TNP-ATP (2 bis 16  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Die auf Grundlage von drei unabhängigen Messungen erhaltenen Daten wurden anschließend angepasst. Anhand der Ergebnisse wurde geschlussfolgert, dass die ATP-Bindung in Anwesenheit von P-Ser46-HPr nicht beeinflusst wird. will. Einh., willkürliche Einheit

### 2.3.6 Versuche zur Eingrenzung der genauen Bindestelle in MalK1

Zur Eingrenzung der Bindestelle von P-Ser46-HPr innerhalb von MalK1 sollte ein Verfahren angewendet werden, über das bereits erfolgreich die Interaktionsstelle zwischen der homodimeren ATPase MutL und der Endonuklease MutH aufgedeckt wurde (Ahrends *et al.*, 2006). Das XACM-Verfahren beruht auf dem kommerziell erhältlichen trifunktionalen Quervernetzer 2-[N <sup>$\alpha$</sup> -Benzoylbenzoicamido-N<sup>6</sup>-(6-biotinamidocaproyl)-L-lysinylamido]ethyl Methanethiosulfonat (MTS-BP-Bio) und kombiniert bereits etablierte Methoden wie UV-Quervernetzungsversuche (X), den Verdau der vernetzten Produkte, die Affinitätsreinigung der biotinylierten Peptide (A), chemische Kodierungen der quervernetzten Peptide (C)



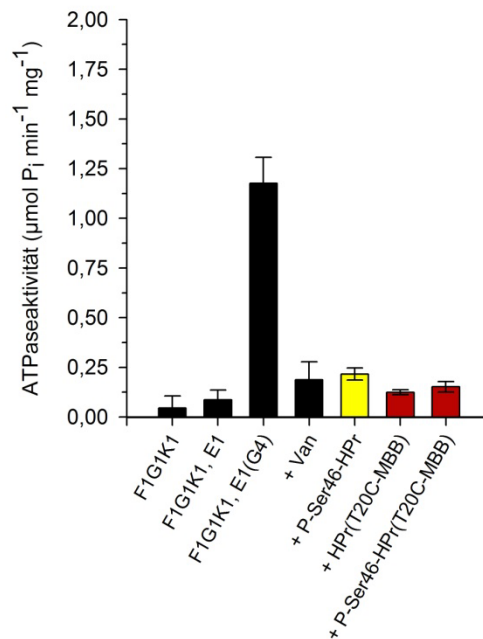
gefolgt von MALDI-TOF Massenspektrometrie (M), um Proteininteraktionsstellen zu identifizieren (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Schematische Darstellung der XACM-Methode bezogen auf die Interaktion von P-Ser46-HPr mit MalK1 (verändert nach Ahrends *et al.*, 2006).** (A) Struktur des trifunktionalen Quervernetzers MTS-BP-Bio. Dieser besteht aus einer Methanethiosulfonatgruppe für die SH-Kopplung, einer Biotingruppe für eine Affinitätsreinigung und einer Benzophenongruppe für Quervernetzungen unter UV-Licht. (B) Übersicht der XACM-Methode zur Identifizierung von Proteininteraktionsstellen auf der Ebene von Peptiden. (1) Ein Protein, wie zum Beispiel HPr(T20C), wird an der Thiolgruppe unter Bildung einer Disulfidbindung mit MTS-BP-Bio modifiziert. (2) Der Interaktionspartner, wie zum Beispiel MalF1G1K1<sub>2</sub>, wird zur Komplexbildung hinzugegeben. (3) Die Quervernetzung der Benzophenongruppe zum Interaktionspartner wird durch Bestrahlung bei 365 nm initiiert. (4) Proteine und die quervernetzten Produkte werden über Proteasen verdaut. (5) Die quervernetzten Peptide werden an ihrer Disulfidbindung aufgetrennt und übertragen damit die Biotingruppe auf das Peptid des Interaktionspartners (zum Beispiel MalK1). (6) Peptide mit einer Biotingruppe werden an Streptavidin ummantelte magnetische Kügelchen gebunden. (7) Der Ansatz wird geteilt und die biotinylierten Peptide an der freien Thiolgruppe des Quervernetzers mit N-Methylmaleimid (NMM) oder N-Ethylmaleimid (NEM) chemisch kodiert um zwei Produkte mit Massendifferenzen von 14 atomaren Masseneinheiten zu erhalten. (8) Die kodierten Peptide werden kombiniert und eluiert. (9) Kodierte Peptide werden über MALDI-TOF MS charakterisiert.

HPr(T20C) wurde dafür über 30 Minuten im Dunkeln mit MTS-BP-Bio markiert (4.3.18). Um die Effizienz der Markierung zu überprüfen wurden die gereinigten Ansätze sofort mit dem Fluorophor MANS markiert. Als Kontrolle diente unmarkiertes HPr(T20C), welches nach Markierung mit MANS in einer stark fluoreszierenden Bande resultierte (Abbildung 36 im Anhang). Die MTS-BP-Bio markierten Proteine zeigten keine Fluoreszenz und sprachen für

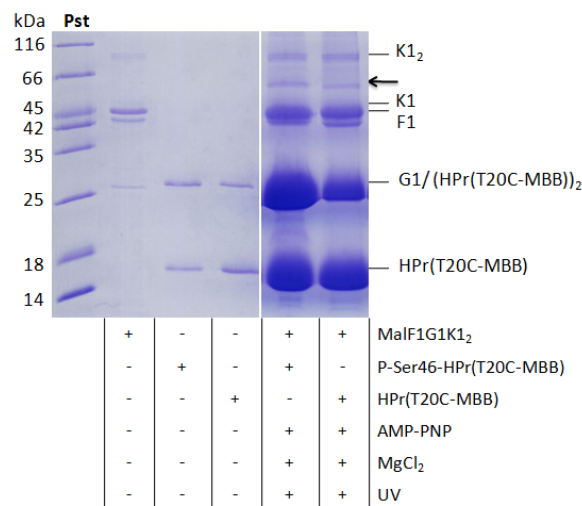
den Erfolg der Markierung. Die folgende Durchführung einer nicht-denaturierenden Elektrophorese in Anwesenheit des markierten Proteins bestätigte die Stabilität der Phosphorylgruppe (nicht dargestellt). Anschließende Inhibierungsexperimente des in Liposomen eingebauten Transportkomplexes in Anwesenheit des markierten Proteins zeigten, dass der Transporter nicht nur in Anwesenheit von P-Ser46-HPr(T20C-MTS-BP-Bio), sondern auch durch unphosphoryliertes markiertes Protein um rund 90 % gehemmt wurde (Abbildung 26).



**Abbildung 26: MalE1/Maltotetraose stimulierte ATPaseaktivität des in Liposomen eingebauten Transporters in Ab- oder Anwesenheit von MTS-BP-Bio-markiertem HPr(T20C) bzw. P-Ser46-HPr(T20C).** In Anwesenheit von 40 μM P-Ser46-HPr wurde eine 81 %ige Inhibierung der ATPaseaktivität von MalF1G1K1<sub>2</sub> bestimmt (gelber Balken). 40 μM MBB-markiertes HPr(T20C) resultierte, sowohl in der phosphorylierten als unphosphorylierten Form, in einer rund 90 %igen Inhibierung (rote Balken). In Anwesenheit von 0,5 mM Orthovanadat wurde eine 85 %ige Inhibierung erzielt. MBB, MTS-BP-Bio; Van, Orthovanadat

Anschließend wurden die Quervernetzungsreaktionen von HPr(T20C-MTS-BP-Bio) bzw. P-Ser46-HPr(T20C-MTS-BP-Bio) mit dem in Lösung befindlichen Transporter durch eine Bestrahlung bei 366 nm gestartet und die Ansätze über eine SDS-PAGE analysiert. Wie auch schon bei der Quervernetzung zwischen MutL-MTS-BP-Bio und MutH, die in einer Quervernetzungsausbeute von 10 bis 20 Prozent gegenüber dem Ausgangsprotein resultierten (Ahrends *et al.*, 2006), waren nur sehr schwache Quervernetzungsbanden bei rund 60 kDa sichtbar (nicht dargestellt). Dabei war diese sowohl bei der Quervernetzung mit dem phosphorylierten als auch dem unphosphorylierten Protein sichtbar. Durch Erhöhung der eingesetzten Menge an markiertem P-Ser46-HPr (400 μM) konnte die Bande verstärkt (Abbildung 27) und über Immunoblotting MalK1 und HPr(T20C) zugeordnet werden (nicht dargestellt).



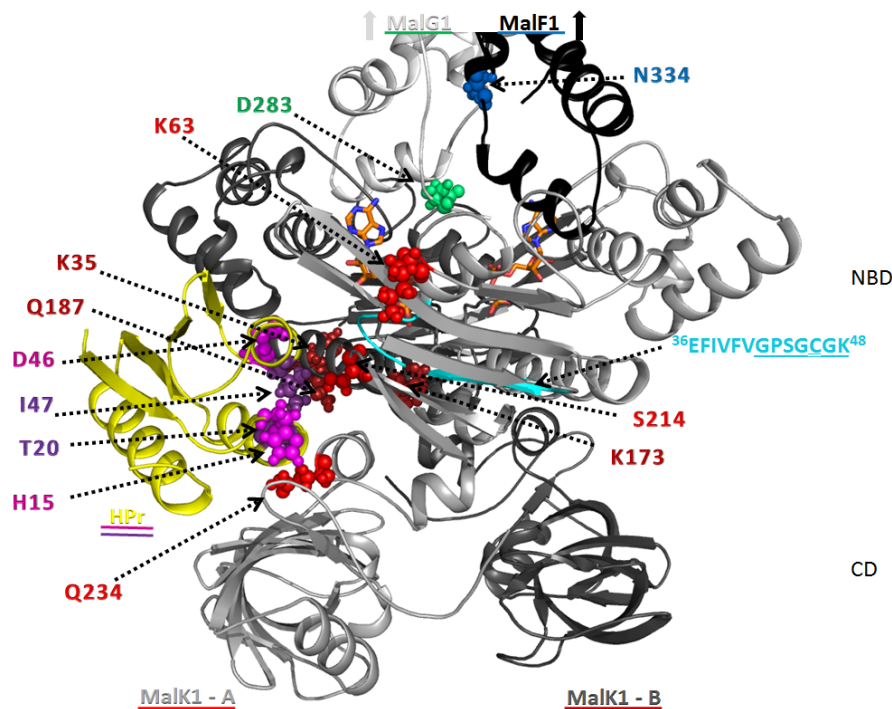


**Abbildung 27: Quervernetzungsversuche von MalF1G1K1<sub>2</sub> mit MTS-BP-Bio-markiertem HPr(T20C) oder P-Ser46-HPr(T20C) in Detergensiösung.** 2,5 µM Komplexprotein wurden mit 400 µM P-Ser46-HPr(T20C-MBB) oder 200 µM HPr(T20C-MBB) versetzt und in Anwesenheit der aufgeführten Kofaktoren bei 366 nm für 30 Minuten bestrahlt. Nach Analyse der Proben (phosphoryliert und unphosphoryliert) über eine SDS-PAGE konnten über Immunoblotting die zusätzlichen Quervernetzungsbanden bei rund 60 kDa (Pfeil) MalK1 und HPr zugeordnet werden. MalG1 und ein Dimer von P-Ser46-HPr(T20C) laufen auf gleicher Höhe bei rund 25 kDa. Pst, Proteinstandard; MBB, MTS-BP-Bio

Trotz Optimierungen der folgenden Schritte des Trypsinverdaus (In-Gel oder In-Lösung Verdaus, 4.3.19) und der Reinigung der biotinylierten Peptide über Strep-Tactin® Sepharose® (4.3.19) gelang es nicht MalK1- oder HPr(T20C)-zugehörige Peptide über die Massenspektrometrie nachzuweisen. Dadurch sollte im Folgenden eine alternative Methode zur Eingrenzung der Bindestelle in MalK1 angewendet werden.

Die bisherigen Versuche ergaben, dass die stark negative Ladung der Phosphorylgruppe von P-Ser46-HPr essentiell für die Hemmung ist, jedoch keine Rolle bei der ATP-Bindung spielt. Damit liegt die Vermutung nahe, dass positiv geladene Reste in MalK1 an der Interaktion beteiligt sind. Um solche Reste zu identifizieren wurde über den ZDOCK Server (Pierce *et al.*, 2014; <http://zdock.umassmed.edu/>) ein Interaktionsmodell von MalK1 (Swiss-Model, Biasini *et al.*, 2014) und HPr(S46D) aus *S. aureus* (PDB: 1KA5; Aspartat an Position 46 imitiert den phosphorylierten Zustand des Proteins) erstellt. In diesem wurden positiv geladene Reste in MalK1 (K26 und K33) und die Reste um die Phosphorylierungsstelle in HPr (K45, D46, I47, M48 und G49) als möglicher Interaktionsbereich vorgegeben. P-Ser46-HPr wurde dabei ähnlich zu EIIA<sup>Glc</sup> an die NBD modelliert, das heißt im Fall einer Bindung von zwei P-Ser46-HPr, würden diese jeweils mit der N-terminalen Domäne des einen und der C-terminalen Domäne des anderen Monomers interagieren (Abbildung 28). Aus dem Modell geht hervor, dass wie auch bei der Interaktion von P-Ser46-HPr mit CcpA bekannt (Jones *et al.*, 1997), die Reste His15 und Ser46 mit MalK1 interagieren. His15 steht dabei möglicherweise mit der C-terminalen Domäne und Ser46 mit der N-terminalen Domäne in Kontakt. Zusätzlich kamen in dem Modell weitere Reste in MalK1 wie K35, K63, K173, S214 und Q187 in der N-

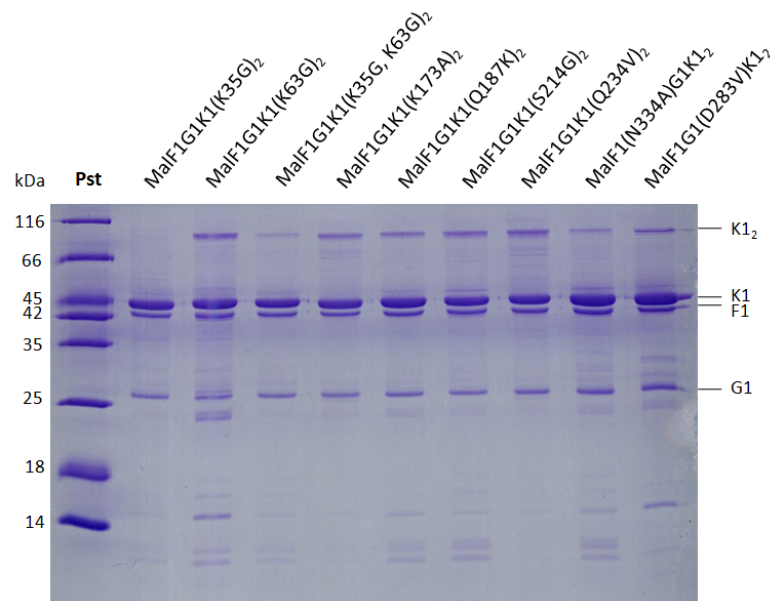
terminalen Domäne und Q234 in der C-terminalen Domäne als möglicher Interaktionsbereich in Frage. Die Abstände für diese Reste zu HPr(S46D) betrugen für K35 24,3 Å; K63 31,2 Å; K173 16,4 Å; Q187 16,6 Å; S214 14,9 Å und Q234 17,8 Å.



**Abbildung 28: Modellierung der HPr(S46D)-Malk1 Interaktionen mittels ZDOCK.** Das Modell wurde mithilfe des ZDOCK Servers (Pierce *et al.*, 2014, <http://zdock.umassmed.edu/>) unter Verwendung des über Swiss-Model (Biasini *et al.*, 2014) berechneten Malk1-Strukturmodells und der Kristallstruktur von HPr(S46D) aus *S. aureus* erstellt. An das Malk1-Dimer, bestehend aus den Untereinheiten A (hellgrau) und B (dunkelgrau), wurde ein Molekül HPr(S46D) (gelb) modelliert (genauere Beschreibung siehe Text). Unter physiologischen Bedingungen ist eine Bindung eines zweiten Moleküls auf der gegenüberliegenden Seite sehr wahrscheinlich. Von MalF1 (weiß) und MalG1 (schwarz) sind lediglich Teile um die Kopplungshelices dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die substituierten Aminosäuren lediglich auf einer Seite des HPr(S46D)/Malk1-Komplexes gekennzeichnet. Die Reste wurden als CPK-Modell dargestellt und farblich hervorgehoben. Die Farben orientieren sich an den restlichen Abbildungen in der Arbeit: MalF1 blau, MalG1 grün, Malk1 A hellrot und Malk1 B dunkelrot. In HPr wurden die ausgetauschten Reste lila (I47, T20) bzw. magenta (H15, D46) hervorgehoben. Ebenfalls wurde der Bereich dargestellt (türkis, inklusive unterstrichenem Walker A-Motiv), welcher bei den massenspektrometrischen Analysen der verdauten Quervernetzungsbande nicht detektiert wurde (Tabelle 11 im Anhang). Gebundenes ATP wurde als Stab-Modell dargestellt (orange). Bearbeitet wurde die Struktur mit PyMol. CD, C-terminale Domäne

Zur Überprüfung des Modells wurden im Folgenden die positiv geladenen Malk1-Reste gegen kleine ungeladene Aminosäuren ausgetauscht (G/A/V) oder basierend auf einen Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener NBDs (Abbildung 37 im Anhang) entsprechend substituiert. Da über die im Abschnitt 2.3.3 erhaltenen Ergebnisse eine zusätzliche Interaktion mit den TMDs nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden außerdem die Primärstrukturen von MalF1 und MalG1 mit den homologen Proteinen MalF

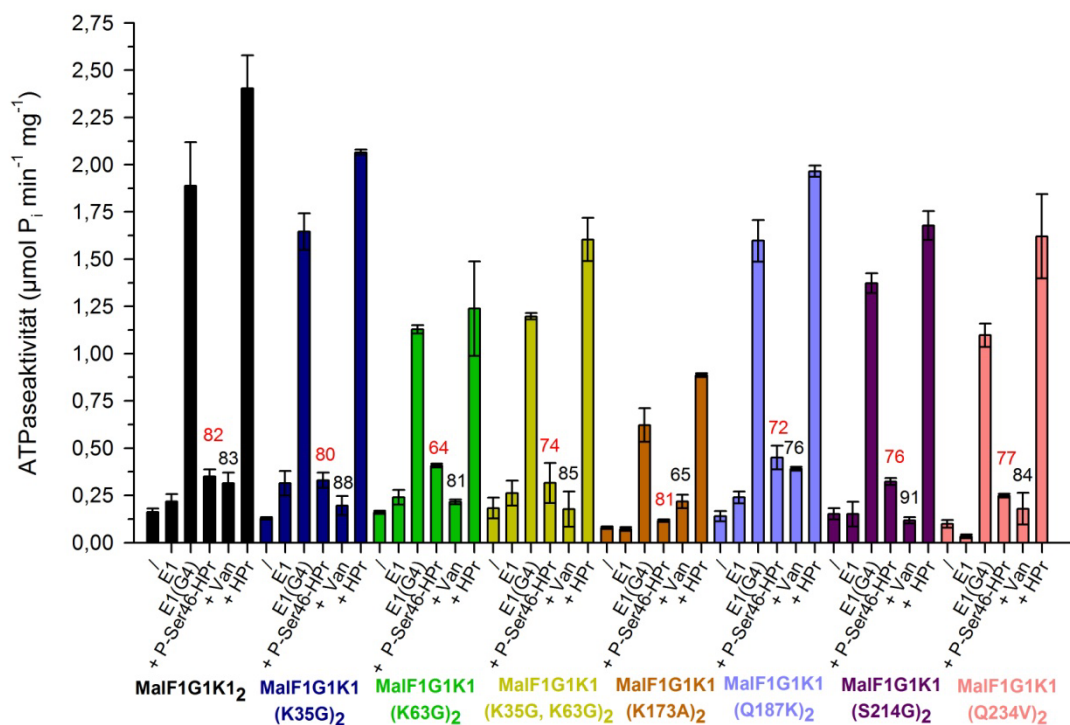
und MalG aus *E. coli* verglichen (nicht dargestellt). Dabei wurden auffällige Unterschiede im C-Terminus von MalG1 (D283) und MalF1 (N334) aufgedeckt. Diese Aminosäuren wurden entsprechend der in den homologen Proteinen vorhandenen Aminosäuren zu Valin beziehungsweise Alanin substituiert. Die Isolierungen der über ortsgerichtete Mutagenese (4.1.2) hergestellten Mutanten MalK1(K35G), MalK1(K63G), MalK1(K35G, K63G), MalK1(K173A), MalK1(Q187K), MalK1(S124G), MalK1(Q234V), MalG1(D283V) sowie MalF1(N334A) erfolgten analog zu der vom Wildtypkomplex (4.2.5, 4.3.3) und resultierten in vergleichbaren Proteinausbeuten von rund 1 mg. In Abbildung 29 sind die gereinigten Komplexvarianten dargestellt.



**Abbildung 29: SDS-PAGE der Komplexvarianten.** Die Proteine wurden in einer Konzentration von 2  $\mu\text{g}$  auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Expression und Proteinreinigung wurde wie unter 4.2.5 und 4.3.3 beschrieben durchgeführt. Pst, Proteinstandard

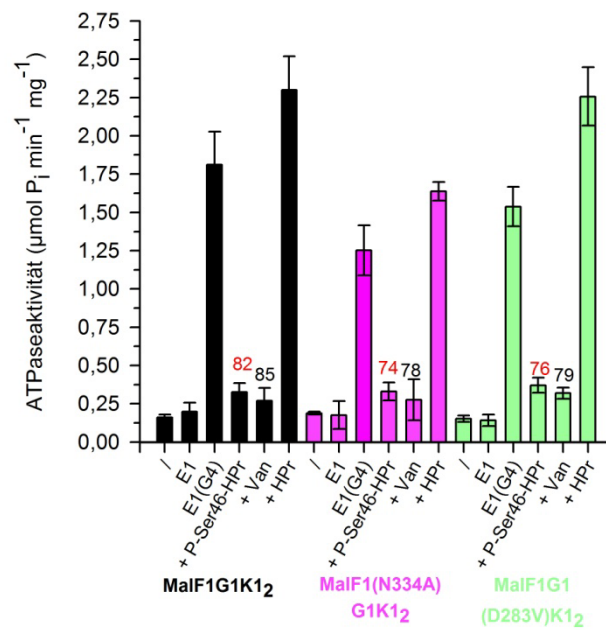
Um abschließend eine Aussage über die Relevanz der mutierten Reste während einer Interaktion mit P-Ser46-HPr treffen zu können, wurden Inhibierungsexperimente in Anwesenheit der in Liposomen eingebauten Komplexvarianten durchgeführt. Eine Aufhebung oder Minderung der Hemmung würde für eine Beteiligung des Restes an der Interaktion mit P-Ser46-HPr sprechen. Wie in Abbildung 30 zu erkennen, hatten alle Komplexvarianten bei denen ein Austausch in MalK1 erfolgte ähnliche MalE1/Maltotetraose stimulierte Aktivitäten zwischen 1 und 2  $\mu\text{mol Phosphat min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Eine Ausnahme bildete der rekonstituierte MalF1G1K1(K173A)<sub>2</sub>-Komplex mit einer stimulierten Aktivität von  $0,6 \pm 0,08 \mu\text{mol Phosphat min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Der mutierte Rest K173 ist laut dem Modell (Abbildung 28) in unmittelbarer Nähe zum Walker A-Motiv lokalisiert und führt möglicherweise zu einer gestörten ATP-Bindung. Zudem konnte in Anwesenheit von Orthovanadat die MalE1/Maltotetraose stimulierte ATPaseaktivität von MalF1G1K1(K173A)<sub>2</sub> als auch MalF1G1K1(Q187K)<sub>2</sub> nicht auf die Basalaktivität reduziert werden. Die geringe stimulierte

Aktivität von MalF1G1K1(K173A)<sub>2</sub> wurde jedoch in Anwesenheit von P-Ser46-HPr um 81 % gehemmt, sodass durch die Substitution die Interaktion mit dem Inhibitor nicht gestört wurde. Alle weiteren Austausche in MalK1 resultierten in ähnlichen Inhibierungen zwischen 72 und 81 %. Eine Ausnahme stellte die Mutante MalF1G1K1(K63G)<sub>2</sub> dar, deren stimulierte Aktivität von 1,1  $\mu\text{mol Phosphat min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  durch P-Ser46-HPr nur um 64 % gehemmt wurde. Die stimulierte Aktivität der Mutante MalF1G1K1(K35G, K63G)<sub>2</sub> wurde hingegen zu 74 % durch den Inhibitor gehemmt.



**Abbildung 30: MalE1/Maltotetraose stimulierte ATPaseaktivität diverser Komplexvarianten (Austausche in MalK1) in Ab- oder Anwesenheit von P-Ser46-HPr oder Orthovanadat.** Die in Liposomen eingebauten Transportkomplexvarianten wurden durch Zugabe von MalE1/Maltotetraose auf ihre stimulierten Aktivitäten untersucht. Die Werte oberhalb der Balken beziehen sich auf die berechneten prozentualen Hemmungen der stimulierten Aktivitäten in Anwesenheit von 40  $\mu\text{M}$  P-Ser46-HPr (rot) oder 0,5 mM Orthovanadat (schwarz). Die ATPaseaktivität des MalF1G1K1(K63G)<sub>2</sub>-Transporters wurde am geringsten durch P-Ser46-HPr beeinflusst. Die ermittelten Aktivitäten beruhen auf drei unabhängigen Messungen. Van, Orthovanadat

In Bezug auf die Komplexvarianten MalF1(N334A)G1K1<sub>2</sub> und MalF1G1(D293V)K1<sub>2</sub> wurden stimulierte Aktivitäten von  $1,3 \pm 0,16$  und  $1,5 \pm 0,12$   $\mu\text{mol Phosphat min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  bestimmt (Abbildung 31). In Anwesenheit von P-Ser46-HPr wurden diese um 74 beziehungsweise 76 % gehemmt. Damit scheinen die ausgewählten Substitutionen in den TMDs nur einen sehr geringen Einfluss auf die Inhibierung durch P-Ser46-HPr zu haben.



**Abbildung 31: MalE1/Maltotetraose stimulierte ATPaseaktivität von MalF1(N334A)G1K1<sub>2</sub> und MalF1G1(D283V)K1<sub>2</sub> in Ab- oder Anwesenheit von P-Ser46-HPr oder Orthovanadat.** Die in Liposomen eingebauten Transportkomplexvarianten wurden durch Zugabe von MalE1/Maltotetraose auf ihre stimulierte Aktivität untersucht. Die Werte oberhalb der Balken beziehen sich auf die berechneten prozentualen Hemmungen der stimulierten Aktivitäten in Anwesenheit von 40 μM P-Ser46-HPr (rot) oder 0,5 mM Orthovanadat (schwarz). Die ermittelten Aktivitäten beruhen auf drei unabhängigen Messungen. Van, Orthovanadat

### 3 Diskussion

Prokaryoten entwickelten im Laufe der Evolution eine Vielfalt an verschiedenen metabolischen Systemen, mit denen sie ein breites Spektrum an Kohlenstoffquellen verwerten und sich schnell an wechselnde Umweltbedingungen anpassen können. Milchsäurebakterien erhalten vorwiegend aus dem Metabolismus von Zuckern Energie. Sie weisen nur eine limitierte biosynthetische Fähigkeit auf, da sie für ihr Wachstum zusätzlich Aminosäuren, Vitamine, Purine sowie Pyrimidine benötigen und besiedeln dadurch nährstoffreiche Nischen. Zur Aufnahme verschiedenster Kohlenhydrate wird eine Vielzahl an Transportsystemen in der Zellmembran dieses Organismus benötigt. Glucose wird über ein PTS, Klasse B Zucker wie Maltodextrine, hingegen beispielsweise über den in dieser Promotionsarbeit untersuchten ABC-Transportkomplex MalE1-F1G1K<sub>2</sub> aufgenommen.

Die Charakterisierung des ATP-abhängigen Aufnahmesystems erfolgte über verschiedene *in vitro* Versuche. Beginnend mit der Analyse des Substratspektrums sollte als erstes das SBP MalE1 charakterisiert werden, um dann im Weiteren den Transporter im Ganzen zu untersuchen. MalE1 ist ein Cluster B/Klasse I SBP (Abbildung 11). Das Protein hat hohe strukturelle Übereinstimmungen mit dem Cyclodextrin-/Maltodextrinbindeprotein aus *T. vulgaris* (1,6 Å *rmsd*; Matsumoto *et al.*, 2009), den *E. coli* (2,3 Å *rmsd*; Quijcho *et al.*, 1997) und *Alicyclobacillus acidocaldarius* (1,7 Å *rmsd*; Schäfer *et al.*, 2004) Maltose-/Maltodextrinbindeproteinen sowie dem *E. rectale* Maltotriosebindeprotein (1,3 Å *rmsd*; Cockburn *et al.*, 2015). Ein Unterscheidungsmerkmal dieser Proteine ist die Fähigkeit in Anwesenheit von kurzen (Maltose) oder langen (Cyclodextrine) Oligoglucosiden eine geschlossene aktive Konformation einzunehmen. Kristallisationsexperimente von MalE1 zeigten, dass sowohl die Komplexbildung mit den linearen Zuckern Maltotriose oder Maltotetraose als auch mit den zyklischen Zuckern  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Cyclodextrin in geschlossene Konformationen resultierten (Abbildung 12 A). Dabei muss u.a. eine Interaktion von drei Glucoseeinheiten des Substrats mit den identifizierten aromatischen Resten W234, Y164 und W353 erfolgen, die ebenfalls bei den Zuckerbindeproteinen aus *T. vulgaris* (W250, Y175, W360; Matsumoto *et al.*, 2009), *Thermus thermophilus* (W235, Y157, W345; Cuneo *et al.*, 2009) und *E. coli* (W230, Y155, W340; Quijcho *et al.*, 1997) vorkommen. Das SBP bindet die Zucker, mit Ausnahme von  $\alpha$ -Cyclodextrin und Maltose, nahezu gleichwertig mit Dissoziationskonstanten um 50  $\mu$ M (Tabelle 2 und 3). Diese waren damit 10- bis 100-fach schlechter im Vergleich zu einer Vielzahl an Maltodextrin-/Cyclodextrinbindeproteinen aus anderen Organismen (Thomson *et al.*, 1998; Pajatsch *et al.*, 1998; Hülsmann *et al.*, 2000; Evdokimov *et al.*, 2001; Schönert *et al.*, 2001; Tonojuka *et al.*, 2007; Cockburn *et al.*, 2015). Eine funktionelle Einschränkung des verwendeten MalE1( $\Delta$ 1-35) wurde durch eine nur zweifach bessere Affinität des linkerregionenthaltenden MalE1( $\Delta$ 1-22<sub>C23A</sub>) zu Maltotetraose und die Bildung von geschlossenen ligandierten Strukturen von MalE1( $\Delta$ 1-35) widerlegt. Diese Ergebnisse bestätigten, dass die flexible Region nicht für die korrekte Faltung des Proteins notwendig war. Eine schlechtere Affinität aufgrund des aus dem Cytosol von *E. coli*

isolierten bereits substratbeladenen SBP's, wurde durch den Erhalt von offenen substratfreien Konformationen widerlegt. Die schlechten Affinitäten erklären sich möglicherweise durch die geringe Anzahl an Wasserstoffbrücken zum gebundenen Substrat (2.1.5). MalE<sub>E. coli</sub> bindet beispielsweise Maltotriose über 21 Wasserstoffbrückenbindungen zu 17 Aminosäureresten und zu acht Wassermolekülen und resultiert in einen  $K_d$  von 0,2  $\mu\text{M}$  (Quiocho *et al.*, 1997; Sharff *et al.*, 1992). Im Gegensatz dazu wird das gleiche Substrat in MalE1 nur über acht potenzielle direkte Wasserstoffbrücken gebunden und zusätzlich über sechs indirekte von an dem Protein gebundenen Wassermolekülen (Abbildung 12 A). Diese schwache Bindung könnte ein Grund für den 200fach schlechteren  $K_d$  von rund 40  $\mu\text{M}$  sein (Tabelle 2 und 3).

Am auffälligsten war die innerhalb der Studien bestimmte fehlende Affinität des Malto-/Cyclodextrinbindepoteins MalE1 zu Maltose (Abbildung 8, 9 und 10). Diese wurde ebenfalls für andere Maltodextrinbindepoteine aus *P. furiosus* (Evdokimov *et al.*, 2001), *B. subtilis* (Schönert *et al.*, 2001), *T. thermophilus* (Cuneo *et al.*, 2009) oder *E. rectale* (EUR\_01830) (Cockburn *et al.*, 2015) beschrieben. Laut Definition ist die Bindungsenergie eines SBP's ( $\Delta^{\text{app}}G$ ) die Summe der intrinsischen Bindungsenergien des geschlossenen Zustands ( $\Delta^{\text{c}}G_B$ ) und dem energetischen Aufwand, der zur Ausbildung der geschlossenen Konformation in Abwesenheit eines Liganden ( $\Delta^{\text{apo}}G_{\text{OC}}$ ) benötigt wird (Marvin & Hellinga, 2001). Im Fall des MalE aus *E. coli* wurde die fehlende Bindung zu dem kleineren Zucker Glucose damit begründet, dass erst im Fall einer Maltose genügend Bindungen zum Liganden ( $K_d$  0,8  $\mu\text{M}$ ) geknüpft werden. Dadurch entsteht eine ausreichend hohe intrinsische Bindungsenergie (-10 bis -15,7 kcal/mol), sodass der energetische Aufwand zum Schließen ( $\Delta^{\text{apo}}G_{\text{OC}}$  von -1,7 bis -7,4 kcal/mol; Millet *et al.*, 2003) übertroffen wird. Die für MalE1 bestimmten deutlich geringeren Affinitäten und Anzahl der Bindungen zu den Substraten lassen demnach auf eine effektive Bindung von Liganden erst ab mindestens drei Zuckermolekülen schließen.

Im Gegensatz zum Bindeprotein MalE1 zeigte der zugehörige Transporter eine deutliche Präferenz für lineare Maltodextrine (Abbildung 13 A), die unter physiologischen Bedingungen durch Hydrolyse des pflanzlichen Polysaccharids Stärke und der Besiedlung des Mundraums und Gastrointestinaltraktes zum Wachstum zur Verfügung stehen. Die bestimmte Sensitivität der MalE1/Maltotetraose stimulierten ATPaseaktivität gegenüber Orthovanadat war ein Beweis für die Kopplung der ATP-Hydrolyse von MalF1G1K1<sub>2</sub> mit dem Substrattransport (Chen *et al.*, 2001). Die *in vitro* Versuche bestätigten zusätzlich die über *in vivo* Versuche erhaltenen Ergebnisse, dass einerseits das Wachstum auf Maltotriose vom *malk1*-Gen abhängt und andererseits *L. casei* BL23 auf Maltotriose als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen kann (Monedero *et al.*, 2008). Auffällig war die fehlende Stimulierung des Komplexes in Anwesenheit nachgereinigter Maltose (Abbildung 14), die jedoch im Widerspruch zu dem über Transportversuche in Anwesenheit von radioaktiv markierter Maltose bestimmten  $K_m$ -Wert von rund 300  $\mu\text{M}$  stand (Monedero *et al.*, 2008). Da die berechneten  $K_m$ -Werte für einen Transport normalerweise mit den bestimmten  $K_d$ -

Werten des Bindeproteins für das jeweilige Substrat übereinstimmen (Bohl & Boos, 1997), kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Bindungstests nicht sensitiv genug waren, um eine so geringe Affinität zu bestimmen. Die fehlende Stimulierung der ATPaseaktivität in Anwesenheit der nachgereinigten Maltose widerspricht jedoch der aufgestellten Hypothese und lässt auch bei diesem Wachstumsversuch die Beteiligung einer Maltotrioseverunreinigung vermuten. Damit stellte sich die Frage, ob ein Wachstum von *L. casei* BL23 auf Maltose überhaupt über einen ABC-Importer vermittelt wird. In *E. faecalis* wird Maltose lediglich über ein PTS mit der Domänenorganisation EIICBA<sup>Mal</sup> aufgenommen (Le Breton *et al.*, 2005; Mokhtari *et al.*, 2013). Dabei formt der PTS-Transporter MalT mit den generellen cytoplasmatischen PTS-Komponenten EI und HPr eine Phosphorylierungskaskade, um so letztendlich die Aufnahme und Phosphorylierung von Maltose zu katalysieren. Eine Recherche deckte jedoch kein vergleichbares PTS zur Aufnahme und Phosphorylierung von Maltose in *L. casei* BL23 auf (<http://www.membranetransport.org/transportDB2/index.html>).

In Bezug auf die zyklischen Zucker zeigte  $\beta$ -Cyclodextrin eine mäßige,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin nur eine sehr geringe oder keine Stimulierung der ATPaseaktivität des Transporters (Abbildung 13 B). Da *in vivo* Versuche bereits ein Wachstum von *L. casei* BL23 auf  $\alpha$ - und  $\beta$ -Cyclodextrin bestätigten (Nicolas Sauvageot, persönliche Mitteilung), kann von einem Transport dieser Zucker ausgegangen werden. Die bestimmten ATPaseaktivitäten lassen jedoch vermuten, dass  $\beta$ -Cyclodextrin durch das Mal1-System und  $\alpha$ -Cyclodextrin durch ein anderes Aufnahmesystem transportiert wird. Unter physiologischen Bedingungen würde demnach MalE1  $\beta$ -Cyclodextrin binden und in die geschlossene Konformation übergehen. Durch eine Interaktion mit MalF1G1K1<sub>2</sub> würde dieser in die *outward-facing* Konformation übergehen, eine Öffnung des SBP's zur Folge haben und den zyklischen Zucker in den Transportkanal entlassen. Hierbei scheint der letzte Schritt, im Vergleich zu den linearen Zuckern, der limitierende zu sein. In der Kristallstruktur des in der *outward-facing* Konformation vorliegenden MalFGK<sub>2</sub> wurde im Transportkanal eine Substratbindestelle in MalF nachgewiesen (Oldham *et al.*, 2013). Eine hohe Sequenzkonservierung, der mit den Zuckern interagierenden Reste in MalF1 und MalF (Abbildung 38 im Anhang), lässt eine solche auch in MalF1 vermuten. Ein entscheidender Unterschied ist jedoch die in Anwesenheit von  $\beta$ -Cyclodextrin erhaltene offene Struktur von MalE<sub>*E. coli*</sub> (Sharff *et al.*, 1993) und die damit verbundene fehlende Interaktion mit dem Transporter. Grund hierfür ist die Blockade des G1-Bindebereichs durch eine verlängerte G1-Bindeschleife der C-terminalen Domäne, die in diesen Bereich ragt. Da in *L. casei* BL23 strukturelle Daten zur Bindestelle in der TMD fehlen und  $\beta$ -Cyclodextrin im Vergleich zu den anderen Cyclodextrinen die höchste Stimulierung zeigte, kann nur spekuliert werden, dass  $\alpha$ -Cyclodextrin zu klein oder  $\gamma$ -Cyclodextrin zu sperrig sind, um adäquat mit den Resten der Bindetasche von MalF1 zu interagieren und damit über dieses System transportiert zu werden.



Eine wichtige Frage in diesem Zusammenhang ist der Ursprung und der Metabolismus der Cyclodextrine in *L. casei* BL23. Das *mal1*-Operon enthält unter anderem das *nplT*- bzw. *dexC*-Gen, welches für eine Neopullulanase (EC 3.2.1.135, *Carbohydrate-Active enZyme Database*, CAZy, <http://www.cazy.org/>) kodiert (Monedero *et al.*, 2008). Weitere Enzyme wie die extrazelluläre Cyclodextringlykosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) und die intrazelluläre Cyclomaltodextrinase (EC 3.2.1.54) oder maltogene Amylase (EC 3.2.1.133) gehören alle der GH13-(Glykosylhydrolase) Familie in der CAZy Datenbank an (Stam *et al.*, 2006; Kumar, 2010). Sie sind strukturell und in Bezug auf ihre katalytischen Eigenschaften kaum voneinander zu unterscheiden (Lee *et al.*, 2002). Unter physiologischen Bedingungen könnte demnach das Produkt des *dexC*-Gens u.a. Aktivitäten als CGTase aufweisen und extrazellulär die  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindungen von Stärke und anderen Polysacchariden spalten und durch einen Ringschluss der entstandenen Zuckerkette zyklische Zucker bilden. Alle bekannten CGTasen katalysieren die Bildung eines Cyclodextringemischs aus unterschiedlichen Anteilen von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin und werden deshalb oft als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CGTase klassifiziert (Tonkova, 1998). Unter physiologischen Bedingungen wäre damit eine durch die CGTase aus *L. casei* BL23 vermehrte extrazelluläre Bildung von  $\beta$ -Cyclodextrin möglich, welches durch MalE1 komplexiert und an den Transporter übermittelt werden könnte. Als Bewohner des Gastrointestinaltraktes von Menschen könnte *L. casei* BL23 Cyclodextrine zusätzlich aus anderen Quellen beziehen. Sie werden entweder Nahrungsmitteln zugesetzt oder dienen beispielsweise in der Pharmazie als Transportstoffe, um lipophile Substanzen einzuschließen (vorwiegend  $\beta$ -Cyclodextrin; Fenyvesi *et al.*, 2016; Übersicht in Jansook *et al.*, 2018). Durch eine fehlende Verdauung dieser aufgenommenen Cyclodextrine im oberen Gastrointestinaltrakt (Kunová *et al.*, 2011) könnten diese, unabhängig von einer CGTase, in geringen Mengen *L. casei* als Kohlenstoffquelle zur Verfügung stehen. Die aufgenommenen zyklischen Zucker könnten anschließend über die intrazelluläre Cyclomaltodextrinase (DexC) linearisiert werden. Das homologe Protein MmdH aus *E. faecalis* konnte ebenfalls die  $\alpha$ -1,4-Bindungen in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Cyclodextrin unter Bildung von Maltose und kleinen Mengen Glucose spalten (Joyet *et al.*, 2017).

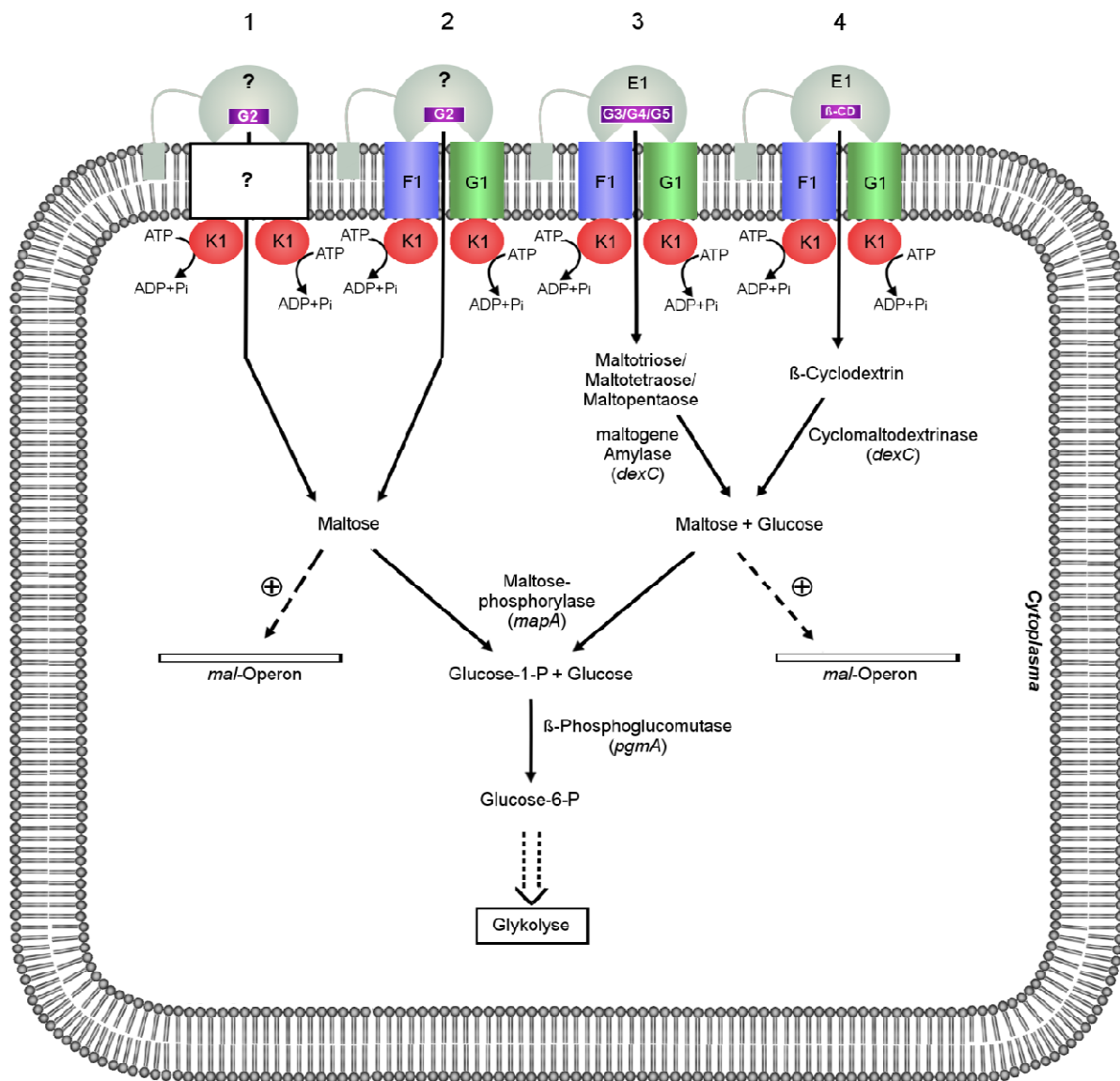
Die mögliche Aktivität von DexC auch als Neopullulanase lässt vermuten, dass vergleichbar zu *E. faecalis* *L. casei* BL23 Isomere der Maltotriose bilden kann (Lee *et al.*, 2002). Panose und Isopanose werden während des Abbaus des extrazellulären Polysaccharids Pullulan gebildet und unterscheiden sich in einer zusätzlichen  $\alpha$ -1,6-glykosidischen Verlinkung von zwei der drei Glucoseeinheiten (Imanaka & Kuriki, 1989; Hansen *et al.*, 2008). Diese Isomere sowie längere Maltodextrine (keine Maltotriose) werden in *E. faecalis* über den ABC-Transporter MdxEFG-MsmX aufgenommen (Sauvageot *et al.*, 2017). Über die isothermale Titrationskalorimetrie wurde jedoch keine Affinität von MalE1 zu den Isomeren nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls resultierten Kristallisationsexperimente in Anwesenheit von Panose in maltotriosegebundene MalE1-Strukturen (Daten nicht gezeigt). Die abschließend in Anwesenheit von Panose und Isopanose bestimmten geringen stimulierten Aktivitäten, stammten wahrscheinlich aus Verunreinigungen des Substrats mit

Maltotriose (Daten nicht gezeigt, Reinheitsgrad von  $\geq 98\%$  (Megazyme) und  $> 95\%$  (Sigma-Aldrich)). Insgesamt sprechen diese Daten für eine fehlende Affinität des Systems zu den Isomeren der Maltotriose.

Zusammenfassend kann das in Abbildung 5 erstellte Modell zur Aufnahme und Verstoffwechselung von Maltose in *L. casei* BL23 (Monedero *et al.*, 2008) durch die in dieser Promotionsarbeit erhaltenen Daten verändert bzw. erweitert werden (Abbildung 32). Die unter physiologischen Bedingungen bei der Spaltung von Polysacchariden entstehende Maltose, könnte über zwei Wege in die Zelle gelangen:

1) Die erste Möglichkeit besteht darin, dass ein unbekannter nur aus dem SBP und TMDs bestehender Maltosetransporter durch die ATPase MalK1 energetisiert wird. In Gram-positiven Bakterien wurden bereits mehrfach Gengruppen beschrieben, die für Kohlenstoff ABC-Transporter kodieren und denen ein NBD-Gen fehlt (Schlösser *et al.*, 1997; Schönert *et al.*, 2001; Scheffel *et al.*, 2004; Andersson *et al.*, 2005; Marion *et al.*, 2011). In *E. faecalis* wurde beispielsweise ein Operon aufgedeckt, welches aus den Genen für das Bindeprotein MdxE sowie den zwei integralen Membranproteinen MdxF und MdxG besteht. Vervollständigt wird der maltodextrinspezifische MdxEFG-Transporter durch das ATP-bindende Protein MsmX. Dieses dient als ATP-Hydrolase für mehrere ABC-Transportsysteme (Ferreira & Sá-Nogueira, 2010) und ist im Gegensatz zum *malK1*-Gen nicht mit dem *mdxEFG*-Operon verbunden. Auf Grundlage der *malF1*- und *malG1*-Sequenzen wurden bei der Suche in BLAST keine vergleichbaren Cluster in *L. casei* BL23 aufgedeckt.

2) Andererseits könnte ein außerhalb des *mal1*-Operon kodiertes Zuckerbindeprotein mit geringer Affinität zu Maltose, das Substrat an das Mal1-System liefern. Ein möglicher Kandidat wäre das MalE2-Bindeprotein des zweiten mutmaßlichen Kohlenhydrat-transporters (Monedero *et al.*, 2008; Abbildung 5). Die höchste Sequenzidentität besitzt MalE2 mit dem *sn*-Glycerol-3-Phosphat (G3P)-Bindeprotein UgpB des UgpAEC<sub>2</sub> ABC-Importsystems aus *E. coli* (25 %; Wuttge *et al.*, 2012). Das gereinigte Protein hatte jedoch keine Affinitäten zu Maltose, Maltotetraose oder G3P (Daten nicht gezeigt). Andererseits wurden im *L. casei* BL23 Genom zwei Gene entdeckt, die für ‚orphan‘ Zucker-BPs kodieren (CAQ65410 und CAQ68093) und nicht mit TMDs oder NBDs von Transportern in Verbindung stehen (<https://www-abcdb.biotoul.fr/>). Die im Rahmen einer Bachelorarbeit von T. Wietelmann (2018) durchgeführten Bindungsstudien der isolierten Proteine deckten jedoch bereits eine fehlende Affinität zu Maltose auf.



**Abbildung 32: Mögliche Funktionen des ABC-Importers MalE1-F1G1K1<sub>2</sub> und der Katabolismus der aufgenommenen Zucker.** 1) MalK1 energetisiert einen bisher unbekannten Maltosetransporter und ermöglicht so die Aufnahme von Maltose in die Zelle. 2) Ein bisher unbekanntes Zuckerbindepotein bindet Maltose und übergibt es an den ABC-Importer. 3) Wie in dieser Arbeit belegt, werden lineare Maltodextrine wie Maltotriose, Maltotetraose und Maltopentaose über den MalE1-F1G1K1<sub>2</sub>-Transporter aufgenommen. Diese werden über eine maltogene Amylase (*DexC*) wahrscheinlich zu Maltose und Glucose gespalten. 4) Der zyklische Zucker β-Cyclodextrin wird über das ABC-Importsystem aufgenommen und das Produkt des *dexC*-Gens spaltet möglicherweise als Cyclomaltodextrinase den zyklischen Zucker in Maltose und Glucose. Intrazelluläre Maltose würde dann durch das Produkt des *mapA*-Gens (Maltosephosphorylase) phosphoryliert, durch die β-Phosphoglucomutase zu Glucose-6-Phosphat umgewandelt und in die Glykolyse eingeschleust werden. Intrazelluläre Maltose stimuliert zusätzlich das *mal*-Operon. G2, Maltose; G3, Maltotriose; G4, Maltotetraose; G5, Maltopentaose; β-CD, β-Cyclodextrin

Lineare Oligoglucoside und  $\beta$ -Cyclodextrin können hingegen über folgende Wege aufgenommen und verstoffwechselt werden:

3) Maltotriose, Maltotetraose und Maltopentaose werden über MalF1G1K1<sub>2</sub>-E1 aufgenommen und intrazellulär unter anderem in Maltose zerlegt. Zur Verwertung der linearen Zucker ist das Produkt des *dexC*-Gens notwendig. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von DexC aus *L. casei* BL23 mit MmdH aus *E. faecalis* deckte eine 65 %ige Übereinstimmung auf. Dieses Enzym spaltet Maltodextrine mit einer geraden Anzahl an Glucoseeinheiten (Maltotetraose etc.) in Maltosemoleküle sowie Maltodextrine mit einer ungeraden Anzahl an Glucoseeinheiten (Maltotriose etc.) in Maltose und Glucose (Joyet *et al.*, 2017). In *L. casei* BL23 könnten demnach durch die Aktivität der maltogenen Amylase (EC 3.2.1.133) ebenfalls Glucose und Maltose gebildet werden, um dann letzteres durch das Produkt des *mapA*-Gens (Maltosephosphorylase) zu phosphorylieren. Glucose-1-Phosphat kann im Folgenden durch die  $\beta$ -Phosphoglucomutase (Produkt von *pgmA*) in Glucose-6-Phosphat umgewandelt und dann in die Glykolyse eingeschleust werden.

4) Der zyklische Zucker  $\beta$ -Cyclodextrin wird ebenfalls über das MalE1-F1G1K1<sub>2</sub>-System aufgenommen und intrazellulär möglicherweise durch das Produkt des *dexC*-Gens, das in dem Fall eine Aktivität als Cyclomaltodextrinase (EC 3.2.1.54) aufweist, in Glucose und Maltose gespalten. Über die im Punkt 3 beschriebenen Schritte wird Maltose letztendlich zu Glucose-6-Phosphat umgewandelt und in die Glykolyse eingeschleust.

Die Aufnahme der Klasse B Zucker erfolgt jedoch nur, wenn keine Glucose oder andere Klasse A Zucker vorhanden sind. Diese verhindern indirekt, durch Stimulierung der HprK-Aktivität und der daraus resultierenden vermehrten Bildung von P-Ser46-HPr, die Aufnahme der weniger präferierten Zucker. Die in dieser Promotionsarbeit erhaltenen Ergebnisse der Interaktion des ABC-Importsystems MalE1-F1G1K1<sub>2</sub> mit P-Ser46-HPr lieferten erstmals direkte Beweise, dass die ATPaseaktivität des Transporters durch das phosphorylierte Protein um bis zu 85 % inhibiert wird (Abbildung 17 A). Diese Hemmung wurde *in vitro* durch einen 50fach molaren Überschuss an P-Ser46-HPr gegenüber dem Transportkomplex erreicht. Da unter physiologischen Bedingungen das HPr-kodierende Gen konstitutiv exprimiert wird und damit HPr in ausreichenden Mengen in der Zelle vorhanden sein sollte, ist dieser starke Überschuss durchaus relevant. Vergleichbare Mengen wurden auch zur maximalen Hemmung (73 %) des Maltose-/Maltodextrintransporters durch EIIGlc benötigt (Landmesser *et al.*, 2002). Aktivitätsmessungen in Anwesenheit von P-Ser46-HPr(I47T) bestätigten aufgrund der fehlenden Inhibierung die *in vivo* Versuche (Gauthier *et al.*, 1997). Frühere Arbeiten zeigten, dass die Mutante im Vergleich zum Wildtypprotein deutlich langsamer phosphoryliert wurde, möglicherweise resultierend aus einer gestörten Interaktion mit der HprK (Mazé *et al.*, 2004). Die *in vitro* Versuche weisen nun zusätzlich

darauf hin, dass trotz vollständiger Phosphorylierung des Proteins durch die HprK (Abbildung 16 B) der für die Inhibierung erforderliche Kontakt mit dem Transporter nicht gegeben ist.

In Anwesenheit der unphosphorylierten HPr-Varianten wurde bei allen Aktivitätsmessungen eine Stimulierung der Aktivität um rund 10 % bestimmt (Abbildung 17, 19 und 20). HPr(T20C) löste sogar eine 36 %ige Stimulierung aus (Abbildung 19). Der Grund hierfür ist unklar. Durch eine Erhitzung der Proteine auf 90°C konnte eine mögliche Verunreinigung ausgeschlossen werden. Da auch in Anwesenheit von BPM- (nicht dargestellt) und MTS-BP-Bio- (Abbildung 27) markiertem HPr eine Quervernetzungsbande nachgewiesen wurde, scheint das unphosphorylierte Protein auch in dieser Form mit dem Transporter zu interagieren, jedoch nur in der phosphorylierten die Aktivität des Transporters zu inhibieren.

Zur näheren Betrachtung der Interaktion wurde ein Hill-Koeffizient bestimmt (Abbildung 17 B). Dieser ist ein Ausdruck für die Stärke der Kooperativität der Bindungsstellen untereinander und weniger ein Maß für die Anzahl der Bindungsstellen oder an der Bindung beteiligten Untereinheiten (Weiss, 1997). Im Fall von P-Ser46-HPr ( $1,4 \pm 0,1$ ) würde demnach die Bindung von einem Molekül an den Transporter, die Bindung eines weiteren erleichtern (positive Kooperativität). In Bezug auf das MalFGK<sub>2</sub>-EIIA<sup>Glc</sup>-System wurde vergleichbar ein Hill-Koeffizient von  $1,8 \pm 0,2$  bestimmt (Bao & Duong, 2013) und anhand einer Kokristallisation eine 2:1 Stöchiometrie von EIIA<sup>Glc</sup> und MalFGK<sub>2</sub> bestätigt (PDB: 4JBW; Chen *et al.*, 2013).

Über Quervernetzungsversuche in Anwesenheit von BPM wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit, erstmals eine Interaktion von P-Ser46-HPr mit der Malk1-Untereinheit bewiesen (Abbildung 21, 22 und 23). Diese Methode wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um u.a. Interaktionen des *E. coli* Maltose-/Maltodextrin-ABC-Transporters mit MalE (Daus *et al.*, 2007) sowie von MutL mit MutH des *E. coli* DNA-Reparatursystems MutHLS (Giron-Monzon *et al.*, 2004) nachzuweisen. Innerhalb der massenspektrometrischen Analysen der trypsinverdauten Quervernetzungsprodukte waren die Sequenzabdeckungen für die einzelnen Proteine nie 100 % (Tabelle 11 im Anhang). Das Peptid 24-47 hat in HPr(T20C) eine Masse von 2552,37 und in HPr von 2550,4. Trotz Anpassung der Datenbanken wurden dieses und das Peptid 65-101 sowohl in P-Ser46-HPr(T20C) als auch in der Quervernetzungsbande nicht detektiert. Möglicherweise waren diese zu groß, um in den Messbereich zu fallen (maximal m/z 4000) oder zu hydrophob, um detektiert werden zu können. Zusätzlich konnte das Peptid 56-68 (Primärsequenz 36-48) von Malk1 in der Quervernetzungsbande nicht identifiziert werden (Tabelle 11 im Anhang). Das Signal dieses Peptids war jedoch auch schon in der Negativkontrolle sehr schwach. Auffällig enthält es das einzige Cystein innerhalb von Malk1 und setzt sich größtenteils aus Resten des Walker A-Motivs zusammen. Diese sind in der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu den β- und γ-Phosphatresten des Nukleotids involviert (Oldham *et al.*, 2007). Eine CuPhe-Quervernetzung von Malk1(C46)<sub>2</sub> und P-Ser46-HPr(T20C) in An- und Abwesenheit von ATP bestätigte die über strukturelle Daten von Malk<sub>E. coli</sub> aufgestellte Hypothese, dass die Thiolgruppe des Cysteins in Malk1

nicht in der Nukleotidbindung involviert ist (Oldham *et al.*, 2007). Zudem deutete die Quervernetzung auf eine Interaktion des Inhibitors mit der ATPase in der Nähe des Walker A-Motivs hin (Abbildung 23). In dem Strukturmodell wurde ein Abstand der zu vernetzenden Cysteine von 15 Å ermittelt (Abbildung 28). CuPhe kann jedoch bis zu einem Abstand von 30 Å vernetzen, weshalb auch nur von ‚Nähe‘ gesprochen werden kann. Somit wäre es sinnvoll, weitere Quervernetzungen mit längenspezifischen Quervernetzungsreagenzien durchzuführen. Beispiele dafür sind 1,2-Ethandiyl-Bismethanthiosulfonat (EBS) mit einer maximalen Länge zwischen den Disulfidbindungen von 5,2 Å; 1,6-Hexandiyl-Bismethanthiosulfonat (HBS) mit 10,4 Å und 3,6,9,12,15-Pentaoxaheptadecan-1,17-diyl-Bismethanthiosulfonat (PBS) mit 24,7 Å (Loo & Clarke, 2001). Über die entstandenen Vernetzungsbanden könnten dann detailliertere Aussagen über den Abstand von P-Ser46-HPr zum Walker A-Motiv getroffen werden.

Durch die Interaktion von P-Ser46-HPr mit MalK1 könnte die ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse oder die Freisetzung der Hydrolyseprodukte beeinflusst werden. Eine beeinträchtigte ATP-Bindung konnte, vergleichbar zu EIIA<sup>Glc</sup> (Bao & Duong, 2013), bereits ausgeschlossen werden (Abbildung 24). Die Phosphorylgruppe von P-Ser46-HPr blockiert demnach nicht die  $\gamma$ -Phosphatbindestelle des Walker A-Motivs. Möglicherweise interagiert P-Ser46-HPr vergleichbar zu Vanadat mit der ATPase. Das Phosphatanalogon hat einen ähnlichen Kontaktbereich wie das  $\gamma$ -Phosphat, bindet jedoch nur an eine Nukleotidbindestelle (Oldham & Chen, 2011 b). Nach einem Schritt der ATP-Hydrolyse und Komplexierung von Vanadat mit ADP wird der Transporter in einem Übergangszustand fixiert (Chen *et al.*, 2001). Um zukünftig herauszufinden, ob die Hydrolyse von ATP und/oder die Freisetzung von ADP und  $P_i$  durch P-Ser46-HPr gehemmt werden, könnten Versuche vergleichbar zu EIIA<sup>Glc</sup> und MalFGK<sub>2</sub> in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ATP durchgeführt werden (Bao & Duong, 2013). Dafür wurde der rekonstituierte Transporter in Anwesenheit von MalE/Maltose und  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  oder  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  inkubiert. Freie Nukleotide wurden entfernt und die an den Transporter gebundenen durch eine Dünnschichtchromatographie und folgende Autoradiographie sichtbar gemacht. Dabei zeigte sich, dass in An- oder Abwesenheit von EIIA<sup>Glc</sup> die Menge an gebundenem ADP und  $P_i$  unverändert war und damit EIIA<sup>Glc</sup> die Affinität von MalFGK<sub>2</sub> zu ADP und  $P_i$  weder erhöht noch herabsetzt. Schließlich wurde der Einfluss von EIIA<sup>Glc</sup> auf den ATP-Hydrolyseschritt überprüft. Eine in Anwesenheit von EIIA<sup>Glc</sup> 50 %ige Abnahme der Hydrolyse von ATP-Molekülen verdeutlichte, dass die Bindung von EIIA<sup>Glc</sup> an den Transporter die Spaltung von ATP verhindert (Bao & Duong, 2013).

Ob der Weg der Inhibierung der gleiche wie in *E. coli* ist, muss in Zukunft über weiterführende Experimente geklärt werden. Über Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie wurde im Fall vom *E. coli* Maltose-ABC-Transporter eindeutig gezeigt, dass innerhalb des Induktorausschlusses das ATP-abhängige Schließen des MalK-Dimers durch die Bindung von EIIA<sup>Glc</sup> verhindert wird (Wuttge *et al.*, 2016). Vorbereitend für vergleichbare Messungen wurden bereits die drei natürlichen Cysteine des Komplexes

(F1(C226)G1(C256)K1(C46)) zu Serin oder Alanin ausgetauscht. Diese resultierten jedoch in funktionell stark eingeschränkte Komplexvarianten. Lediglich die Cys/Ser-Mutation innerhalb des Malk1-Dimers blieb mit einer 77 %igen Hemmung durch P-Ser46-HPr nahezu unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Als geeignete Mutante mit einer 74 %igen Inhibierung wurde MalF1G1K1(C46S, A20C, A134C)<sub>2</sub> bereits hergestellt. Laut Strukturmodell zeigen beide Cysteine durch das Schließen des Malk1-Dimers eine Abstandsänderung von 31 Å auf 17 Å und wären so nach einer MTSSL-Markierung zur ESR-Spektroskopie geeignet.

Ein großes Interesse besteht in der genauen Analyse des Kontaktbereichs von P-Ser46-HPr in Malk1. Obwohl Malk1 und MalK eine hohe Aminosäuresequenzübereinstimmung haben (46 %), müssen sich die Kontaktstellen aufgrund der Interaktion von Malk1 mit dem phosphorylierten Protein und MalK mit dem unphosphorylierten EIIGlc unterscheiden. Übereinstimmend damit ist die Beobachtung, dass die beiden Inhibitoren nicht die Aktivitäten der Transporter aus dem anderen Organismus inhibieren können (Daten nicht gezeigt). Es wurde dadurch eine Interaktion der stark negativ geladenen Phosphorylgruppe von P-Ser46-HPr mit positiv geladenen Resten in Malk1 angenommen. Zur Eingrenzung der Kontaktstelle wurde das XACM-Verfahren angewendet (Ahrends *et al.*, 2006). Voraussetzung war eine Markierung der Proteine mit dem Label MTS-BP-Bio. Die durch HPr(T20C-MTS-BP-Bio) bestimmte 90 %ige Inhibierung des Transporters (Abbildung 26) und im Gegensatz dazu fehlende Hemmung durch HPr(T20C-BPM) (Abbildung 20) ließ vermuten, dass das MTS-BP-Bio Label P-Ser46-HPr nachahmte. Quervernetzungsversuche resultierten in einer neuen Bande, die über Immunoblot ebenfalls Malk1 und HPr(T20C) zugeordnet werden konnte (Abbildung 27). Die fehlende Identifikation Malk1- oder HPr(T20C)-zugehöriger Peptide kann auf verschiedene Ursachen basieren. Einerseits kann bei Quervernetzungsstudien in Kombination mit massenspektrometrischen Analysen eine unzureichende Fragmentierung der vernetzten Peptide die sichere Identifikation des Vernetzungsproduktes beeinträchtigen. Andererseits wird die MS-Analyse einer durch UV-Licht ausgelösten Quervernetzung erschwert. Diese kann an jeder beliebigen Aminosäure des Interaktionspartners stattfinden und die photoreaktive Gruppe aufgrund seiner räumlichen Flexibilität an mehreren Stellen des Zielproteins binden. Die Herausforderung besteht folglich darin, eine MS/MS-Fragmentierung nach entsprechend großen Modifikationen zu erhalten (Sinz, 2006; Lu *et al.*, 2017). Diese Schwierigkeiten führten dazu, dass mit diesem Verfahren die spezifische Bindestelle von P-Ser46-HPr an Malk1 nicht genauer identifiziert werden konnte.

Vielversprechend, jedoch ähnlich der Suche nach einer Stecknadel im Heuhaufen, waren die Mutationsanalysen in Malk1. Fokussiert wurde sich dabei auf positiv geladene Reste, die mit der Phosphorylgruppe eine ionische Wechselwirkung eingehen könnten (Abbildung 28). Die Substitutionen dieser Aminosäuren zu ungeladenen Resten oder Resten die vergleichbar in *E. coli* gefunden wurden, resultierten jedoch bei keiner Mutante in einer Aufhebung der Inhibierung durch P-Ser46-HPr (Abbildung 30, 31). Lediglich die Mutante MalF1G1K1(K63G)<sub>2</sub> zeigte eine reduzierte Inhibierung von 64 %. Schlussfolgernd könnte dieser positiv geladene Rest ein erster möglicher Partner von P-Ser46-HPr und demnach ein Teil des

Interaktionsbereiches sein. Wahrscheinlich wird erst die Kombination von mehreren bei der Inhibierung relevanten Resten zu einer totalen Aufhebung der Hemmung führen. Zusätzlich ist K63 in der Nähe des Walker A-Motivs lokalisiert und würde die erhaltenen Ergebnisse der CuPhe-Quervernetzungsversuche bestätigen.

Zur weiteren Analyse des Kontaktbereichs könnten in Zukunft Cystein-Cystein Quervernetzungen mit P-Ser46-HPr(T20C) in Anwesenheit der bereits beschriebenen längenspezifischen homobifunktionalen Thiosulfonatvernetzer EBS, HBS und PBS durchgeführt werden. Als Interaktionsrest könnte u.a. K63 gewählt werden. In Bezug auf die Interaktion von MalK mit EIIA<sup>Glc</sup> gelang es so den Kontaktbereich zwischen den beiden Proteinen näher einzugrenzen. Dabei wurde übereinstimmend mit den Ergebnissen aus der Kristallstruktur (Chen *et al.*, 2013) eine Interaktion des in EIIA<sup>Glc</sup> identifizierten Bindungsbereichs I mit der N-terminalen Domäne von MalK und des Bindungsbereichs II nahe der C-terminalen regulatorischen Domäne von MalK bestimmt (Wuttge *et al.*, 2016). Weitere Quervernetzungen in Anwesenheit verschiedener Kofaktoren sowie EBS, HBS und PBS könnten Aufschlüsse darüber geben, ob P-Ser46-HPr an jeden Zustand des Transporters binden kann.

Ein Meilenstein in der Erforschung des Induktorausschlusses wäre die Kristallisation des MalF1G1K1<sub>2</sub>-Transporters in Kombination mit dem Inhibitor und die damit zusammenhängende genaue Identifikation des Bindungsbereiches. Da unklar ist, ob der Phosphorylrest während einer Kristallisation stabil wäre, würde sich für diese Versuche die HPr(S46D) Mutante eignen. Damit könnten nicht nur die interagierenden Reste in MalK1, sondern auch die in dem Inhibitor genauer identifiziert werden.



## 4 Material und Methoden

Die Chemikalien, Lösungsmittel und Detergenzien auf die nicht näher eingegangen wurde, wurden von den Firmen Bio-Rad (München), GE Healthcare (Freiburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Hamburg) bezogen. Als Wasser wurde voll entsalztes (VE) oder für Lösungen und Puffer gefiltertes deionisiertes (*A. bidest*) Wasser genutzt. Zum Einstellen der pH-Werte wurde das PHM 93 Reference pH Meter (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) verwendet und Sterilisierungen über Filter (Whatman® Puradisc filters, Porengröße 0,2 µm, Sigma-Aldrich, Hamburg) oder Autoklaven erzielt. Die Prozentangaben bei Puffern stehen für Masse pro Volumen (w/v) bei Feststoffen und für Volumenprozent (v/v) bei Flüssigkeiten.

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Polymerasekettenreaktion

Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte

dNTP Mix	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
ReproFast <i>proofreading</i> Polymerase	Genaxxon Bioscience GmbH (Ulm)
T3000 Thermocycler	Biometra (Göttingen)

Bei der Polymerasekettenreaktion werden gezielt bestimmte Abschnitte einer DNA unter Zuhilfenahme von Oligonukleotiden (10 µM), DNA-Polymerasen und einem bestimmten Temperaturprogramm vervielfältigt. Für die Amplifikation von *malE2* diente chromosomale DNA aus *L. casei* BL23 als *template*. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 4 aufgelistet. Für die Vervielfältigung wurde die ReproFast *proofreading* Polymerase nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### 4.1.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Die Polymerasekettenreaktion wurde zur ortsspezifischen Mutagenese mittels des QuikChange Lightning® Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (San Diego, USA) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers.

#### 4.1.3 Oligonukleotide

In Tabelle 4 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Primer für Klonierungen und ortsgerechte Mutagenesen aufgelistet. Die Oligonukleotide für die Klonierungen von *malE2* wurden so synthetisiert, dass während der PCR am 5'- und 3'-Ende definierte Restriktionsschnittstellen für NdeI und BamHI eingebaut wurden, um später das Einbringen der Fragmente in den gleichermaßen geschnittenen pET15b Vektor zu ermöglichen. Bei den Primern für Mutagenesen wurden in der Bezeichnung die Aminosäuresubstitutionen der resultierenden Proteine verwendet.

**Tabelle 4:** Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Verwendung
MalE2 fw MalE2 rv	ATAATACATATGAAGAGTGATTCCGGCAACCGG ATAATAGGATCCTCACTTGTTGTCTTGATGATGG	Konstruktion von pWS35
F1 <sub>C226A</sub> fw F1 <sub>C226A</sub> rv	CACTGGTTTGGGCGTTGCCGCTACTGTGACG CGTCACAGTAGCGGCAACCGCCCAACCAAGTG	Mutagenese von pFSA125 Konstruktion von pCH13
F1 <sub>N334A</sub> fw F1 <sub>N334A</sub> rv	GCAATTATCCAGGCCTTGCTGAGGATCAAATTGAAGCCG CGGCTTCAATTTGATCCTCAGGCAAGGCCTGGATAATTGC	Mutagenese von pFSA125 Konstruktion von pCH25
G1 <sub>C256A</sub> fw	G CAGTTCAATGCGGTGCCGTATCATTGCGATTCCG	Mutagenese von pCH13

G1 <sub>C256A</sub> <b>rv</b>	CGGAATCGCAATGATGACGGCACCGGCAATGAACTGC	Konstruktion von pCH15
G1 <sub>D283V</sub> <b>fw</b>	CGGTATTACTGCTGGGGCTGTAAAGG	Mutagenese von pFSA125
G1 <sub>D283V</sub> <b>rv</b>	CCTTTAACAGCCCCAGCAGTAATACCG	Konstruktion von pCH11
K1 <sub>C46S</sub> <b>fw</b>	CGGGCCGTCTGGCAGCGGCAAGTCAACAACG	Mutagenese von pCH10
K1 <sub>C46S</sub> <b>rv</b>	CGTTGTTGACTTGCCGCTGCCAGACGGCCCCG	Konstruktion von
K1 <sub>C46A</sub> <b>fw</b>	CGGGCCGTCTGGCGCGCGCAAGTCAACAACG	Mutagenese von pCH10
K1 <sub>C46A</sub> <b>rv</b>	CGTTGTTGACTTGCCGCGGCCAGACGGCCCCG	Konstruktion von pCH14
K1 <sub>A134C</sub> <b>fw</b>	GGTCTGACAGAGTTTCTGTGCCGTAACACAG	Mutagenese von pCH14
K1 <sub>A134C</sub> <b>rv</b>	CTGGTTTACGGCAGAGAACTCTGTGACAGCC	Konstruktion von pCH16
K1 <sub>A134C, A20C</sub> <b>fw</b>	GAAGTACCCGAATTGCGCACAATATTCTGTC	Mutagenese von pCH16
K1 <sub>A134C, A20C</sub> <b>rv</b>	GACAGAATATTGTGCGCAATTCGGGTACTTC	Konstruktion von pCH17
K1 <sub>A134C</sub> <b>fw</b>	GGTCTGACAGAGTTTCTGTGCCGTAACACAG	Mutagenese von pCH9
K1 <sub>A134C</sub> <b>rv</b>	CTGGTTTACGGCAGAGAACTCTGTGACAGCC	Konstruktion von pCH19
K1 <sub>A134C, A20C</sub> <b>fw</b>	GAAGTACCCGAATTGCGCACAATATTCTGTC	Mutagenese von pCH19
K1 <sub>A134C, A20C</sub> <b>rv</b>	GACAGAATATTGTGCGCAATTCGGGTACTTC	Konstruktion von pCH21
K1 <sub>K35G</sub> <b>fw</b>	GCACATTAAGAATGGGGAGTTTCATTGTCTTTGTCCG	Mutagenese von pCH10
K1 <sub>K35G</sub> <b>rv</b>	CCGACAAAGACAATGAATCCCCATTCTTAATGTGC	Konstruktion von pCH20
K1 <sub>K63G</sub> <b>fw</b>	GGCCTTGAGGATATTTCCGGAGGGACGTTAATG	Mutagenese von pCH10
K1 <sub>K63G</sub> <b>rv</b>	CATTACGTCCTCCGAAATATCTCAAGGCC	Konstruktion von pCH22
K1 <sub>K63G</sub> <b>fw</b>	GGCCTTGAGGATATTTCCGGAGGGACGTTAATG	Mutagenese von pCH20
K1 <sub>K63G</sub> <b>rv</b>	CATTACGTCCTCCGAAATATCTCAAGGCC	Konstruktion von pCH23
K1 <sub>Q187K</sub> <b>fw</b>	GCCAAGTTGCATAAGCGCCTTGAAACC	Mutagenese von pCH10
K1 <sub>Q187K</sub> <b>rv</b>	GGTTTCAAGCGCTTATGCAACTTGCC	Konstruktion von pAL136
K1 <sub>S214G</sub> <b>fw</b>	TCGAGTTGTGGTGATGGGCGTTGGCCAGATTCAGC	Mutagenese von pCH10
K1 <sub>S214G</sub> <b>rv</b>	GCTGAATCTGGCCAACGCCCATCACCACAACCTCGA	Konstruktion von pCH24
K1 <sub>K173A</sub> <b>fw</b>	CCAATCTGGATGCTGCATTACGTGTTTCC	Mutagenese von pCH10
K1 <sub>K173A</sub> <b>rv</b>	GGAAACACGTAATGCAGCATCCAGATTGG	Konstruktion von pAL86
K1 <sub>Q234V</sub> <b>fw</b>	CCGCGTAACGTATTTGTGGCTGGTTTTATCG	Mutagenese von pCH10
K1 <sub>Q234V</sub> <b>rv</b>	CGATAAAACAGCCACAAATACGTTACGCGG	Konstruktion von pAL88
ptsH <sub>S46E</sub> <b>fw</b>	GGTAAGAGCGTTAACTTGAAGGAAATCATGG	Mutagenese von pET-ptsH
ptsH <sub>S46E</sub> <b>rv</b>	CCATGATTTCCTTCAAGTTAACGCTCTTACC	Konstruktion von pWS33
ptsH <sub>I47T</sub> <b>fw</b>	GCGTTAACTTGAAGTCTACCATGGGCGTC	Mutagenese von pET-ptsH
ptsH <sub>I47T</sub> <b>rv</b>	GACGCCCATGGTAGACTTCAAGTTAACGC	Konstruktion von pWS34
ptsH <sub>T20C</sub> <b>fw</b>	GCACGTCGGCATGCTTGTGGTACAGGCAGCAAGC	Mutagenese von pET-ptsH
ptsH <sub>T20C</sub> <b>rv</b>	GCTTGCTGCTGTACCAACAAGCATGCCGGACGTGC	Konstruktion von pCH12
ptsH <sub>S46D</sub> <b>fw</b>	GGTAAGAGCGTTAACTTGAAGGATATCATGG	Mutagenese von pET-ptsH
ptsH <sub>S46D</sub> <b>rv</b>	CCATGATATCCTTCAAGTTAACGCTCTTACC	Konstruktion von pWS32
ptsH <sub>K38N</sub> <b>fw</b>	GATATCAACTTGAATACAACGGTAAGAGCG	Mutagenese von pET-ptsH
ptsH <sub>K38N</sub> <b>rv</b>	CGCTCTTACCGTTGTATTCCAAGTTGATATC	Konstruktion von pAL84

#### 4.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Verwendete Materialien, Geräte und Puffer

1 Kb Plus DNA Ladder

UltraPure™ Agarose

Horizon®58 Mini Gel System

UV Transilluminator UVT-20M

Invitrogen (Karlsruhe)

Gibco BRL (Eggenstein)

Gibco BRL (Eggenstein)

Herolab (Wiesloch)

20 x TAE-Puffer	96,8 g/l Tris-HCl (pH 8,0); 13,6 g/l Na-Acetat; 7,4 g/l EDTA
10 x DNA-Probenpuffer	50 % (v/v) Glycerin; 1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 0,1 M EDTA (pH 8,0)

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA erfolgte in horizontalen 1 % (w/v) Agarosegelen in einfach TAE-Puffer. Die zu untersuchenden Proben wurden im Verhältnis 1:10 mit 10fachem Probenpuffer (modifiziert nach Sambrook & Russell, 2001) verdünnt und bei 120 Volt nach ihrer Größe aufgetrennt. Als Referenz diente der 1 Kb Plus DNA Ladder. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden anschließend mithilfe des DNA-interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid (4 µg/ml H<sub>2</sub>O) unter UV-Licht sichtbar gemacht.

#### 4.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem präparativen Agarosegel ausgeschnitten und mithilfe des NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben aus dem Gel eluiert.

#### 4.1.6 Restriktion

Für die folgende Ligation mussten zunächst sowohl das amplifizierte PCR-Produkt als auch der Zielvektor mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen, nach den Angaben des Herstellers (New England Biolabs, Frankfurt am Main), verdaut werden. Die Inkubation erfolgte für zwei bis drei Stunden bei 37°C oder über Nacht bei Raumtemperatur. Linearisierte Vektoren wurden mit USB® Shrimp Alkaline Phosphatase (USB Corp., Cleveland, USA) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert.

#### 4.1.7 Ligation

DNA-Fragmente wurden mit der T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) ligiert. Für einen 20 µl Ligationsansatz wurden 3 µl geschnittener Zielvektor und 14 µl DNA-Restriktionsfragment mit 2 µl 10fachem T4 Ligase Puffer versetzt und nach Zugabe von 1 µl T4 DNA Ligase entweder bei Raumtemperatur für 2 bis 3 Stunden oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit *A. bidest* auf 50 µl aufgefüllt, mit 450 µl *n*-Butanol versetzt und für 10 Minuten bei 11 000 x *g* (Zentrifuge 5418, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das DNA-Pellet in der Vakuumzentrifuge (Savant™ SpeedVac™ DNA 110, Savant Instruments, Farmingdale, USA) getrocknet und abschließend in 10 µl *A. bidest* resuspendiert.

#### 4.1.8 Transformation kompetenter Zellen

Die Plasmidaufnahme in das Cytosol von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook *et al.* (1989). Es wurden je 1 µl Plasmid-DNA zu den CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Zellen (4.2.4) gegeben, diese für 30 Minuten auf Eis inkubiert und ein Hitzeschock bei 42°C für 1 Minute durchgeführt. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis wurden zu den Zellen 500 µl LB-Medium gegeben und diese für eine Stunde bei 37°C (Eppendorf Thermomixer Compact, Hamburg) schüttelnd inkubiert. Abschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 x *g* (Zentrifuge 5418, Eppendorf, Hamburg) für 5 Minuten und ein Ausplattieren der Zellen auf selektiven LB-Platten.

#### 4.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen erfolgte mithilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits (Macherey-Nagel, Düren) gemäß den Anleitungen des Herstellers. Die Lagerung der Plasmide erfolgte bei -20°C.

#### 4.1.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von *in vitro* synthetisierten DNA-Abschnitten erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon (Martinsried).

#### 4.1.11 Plasmide und dessen Konstruktion

In der Diplomarbeit (Homburg, 2010) wurden bereits die Gene *malE1* (pCH1, ohne Signalpeptid- und Linkersequenz), *malF1malG1* (pFSA125) und *malk1* (pCH10) aus dem *mal1*-Operon von *L. casei* BL23 amplifiziert. Im Rahmen einer von G. Leonte (2011) durchgeführten Bachelorarbeit wurde ein *malE1* Gen amplifiziert, bei welchem die Signalsequenz entfernt und das erste Cystein des reifen Proteins zu Alanin ausgetauscht wurde (pGL1). Zusätzlich wurde in dieser Arbeit das um die Signalsequenz- und Linkerregion-verkürzte *malE2* Gen des zweiten Operons amplifiziert (pWS35). Von *malF1G1*, *malk1* und *ptsH* wurden diverse Mutanten mithilfe der ortsgerichteten Mutagenese (4.1.2) hergestellt. Alle verwendeten Plasmide sowie ihre Herkunft und Eigenschaften sind in Tabelle 5 aufgelistet.

**Tabelle 5:** Bezeichnung, Eigenschaften und Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
pET11b	p <sub>T7lac</sub> , Ap <sup>R</sup>	Novagen/Merck (Darmstadt)
pET15b	p <sub>T7lac</sub> , N-term. His <sub>6</sub> -Tag, Thrombinschnittstelle, Ap <sup>R</sup>	Novagen/Merck (Darmstadt)
pAC16b	Derivat des pACYC184 Vektors, Expressionsregion von pET16b, N-term. His <sub>10</sub> -Tag, p <sub>lacI</sub> , Cm <sup>R</sup>	U. Wehmeier (Universität Wuppertal)
pLysS	Gen1 (T7-Lysozym), Cm <sup>R</sup>	Novagen/Merck (Darmstadt)
pCH10	<i>malk1</i> auf pAC16b, Cm <sup>R</sup>	C. Homburg (2010)
pAL86	<i>malk1</i> <sub>K173A</sub> auf pAC16b, Cm <sup>R</sup>	A. Licht (2014)
pAL88	<i>malk1</i> <sub>Q234V</sub> auf pAC16b, Cm <sup>R</sup>	A. Licht (2014)
pCH9	<i>malk1</i> <sub>C46S</sub> auf pAC16b, Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pCH14	<i>malk1</i> <sub>C46A</sub> auf pAC16b, Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pCH16	<i>malk1</i> <sub>C46A, A134C</sub> auf pAC16b, Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pCH17	<i>malk1</i> <sub>C46A, A134C, A20C</sub> auf pAC16b, Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pCH19	<i>malk1</i> <sub>C46S, A134C</sub> auf pAC16b, Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pCH20	<i>malk1</i> <sub>K35G</sub> auf pAC16b, Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pCH21	<i>malk1</i> <sub>C46S, A134C, A20C</sub> auf pAC16b, Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pCH22	<i>malk1</i> <sub>K63G</sub> auf pAC16b, Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pCH23	<i>malk1</i> <sub>K35G, K63G</sub> auf pAC16b, Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pCH24	<i>malk1</i> <sub>S214G</sub> auf pAC16b, Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAL136	<i>malk1</i> <sub>Q187K</sub> auf pAC16b, Cm <sup>R</sup>	A. Licht (2017)
pFSA125	<i>malF1malG1</i> auf pET11b, Ap <sup>R</sup>	F. Scheffel (2010)

pCH7	<i>malF1<sub>C226S</sub>malG1</i> auf pET11b, Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pCH8	<i>malF1<sub>C226S</sub>malG1<sub>C256S</sub></i> auf pET11b, Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pCH11	<i>malF1malG1<sub>D283V</sub></i> auf pET11b, Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pCH13	<i>malF1<sub>C226A</sub>malG1</i> auf pET11b, Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pCH15	<i>malF1<sub>C226A</sub>malG1<sub>C256A</sub></i> auf pET11b, Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pCH25	<i>malF1<sub>N334A</sub>malG1</i> auf pET11b, Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pCH1	<i>malE1Δ1-35</i> auf pET15b, Ap <sup>R</sup>	C. Homburg (2010)
pGL1	<i>malE1Δ1-22<sub>C23A</sub></i> auf pET15b, Ap <sup>R</sup>	G. Leonte (2011)
pWS35	<i>malE2</i> auf pET15b, Ap <sup>R</sup>	S. Wuttge (2015)
pET- <i>ptsH</i>	<i>ptsH</i> auf pET15b, Ap <sup>R</sup>	Mazé <i>et al.</i> , 2004
pCH12	<i>ptsH<sub>T20C</sub></i> auf pET15b, Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
ptsH3	<i>ptsH<sub>I47T</sub></i> auf pET15b, Ap <sup>R</sup>	Mazé <i>et al.</i> , 2004
pAL84	<i>ptsH<sub>K38N</sub></i> auf pET15b, Ap <sup>R</sup>	A. Licht (2014)
pWS32	<i>ptsH<sub>S46D</sub></i> auf pET15b, Ap <sup>R</sup>	S. Wuttge (2014)
pWS33	<i>ptsH<sub>S46E</sub></i> auf pET15b, Ap <sup>R</sup>	S. Wuttge (2015)
pWS34	<i>ptsH<sub>I47T</sub></i> auf pET15b, Ap <sup>R</sup>	S. Wuttge (2015)
pΔ <i>hprK/P</i>	<i>hprK/PΔ1-127<sub>R245A</sub></i> auf pQE30, Ap <sup>R</sup>	Chaptal <i>et al.</i> , 2007

## 4.2 Zellbiologische Methoden

### 4.2.1 Bakterienstämme

In Tabelle 6 sind die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme mit ihren jeweiligen genetischen Charakteristika aufgeführt.

**Tabelle 6:** Bezeichnung, Genotyp und Herkunft der verwendeten Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Herkunft
DH5α	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, lacI<sup>q</sup>ΔM15]</i>	Promega Corporation (Mannheim)
XL10-Gold	<i>Tet<sup>R</sup>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>) Amy Cam<sup>R</sup></i>	Stratagene (San Diego, USA)
BL21 T1 DE3	<i>F ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm λ(DE3) tonA</i>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
BL21 DE3 Fit	<i>F ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm λ(DE3) ptsH</i>	Mazé <i>et al.</i> , 2004
NM522	<i>SupE thi-1 (lac-proAB) (mcrB-hsdSM) (rK<sup>-</sup> mK<sup>-</sup>) [F' proAB lacI<sup>q</sup>ZGM15]</i>	Gough & Murray, 1983

#### 4.2.2 Kulturmedien

In Tabelle 7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Medien zur Zellanzucht von *E. coli* aufgelistet. Diese wurden in VE-Wasser aufgelöst und anschließend für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Für Agarplatten wurden dem Medium 1,5 % (w/v) Agar-Agar hinzugefügt. Die Zellanzuchten zur Isolation von MalE1, MalF1G1K1<sub>2</sub> und HPr erfolgten in TB-, die von MalE2 in TP<sub>i</sub>- und von der HprK in 2 x TY-Medium.

**Tabelle 7:** Zusammensetzung verwendeter Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>LB-Medium</b> (Miller, 1972)	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl →pH 7,0
<b>TB-Medium</b> (Tartof & Hobbs, 1988)	Komplexkomponente: 12 g/l Trypton; 24 g/l Hefeextrakt; 5 g/l Glycerin →pH 7,0  Pufferkomponente: 2,7 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O; 10,4 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> →separat autoklavieren und vor Zellanzucht zusammengeben
<b>TP<sub>i</sub>-Medium</b> (Moore <i>et al.</i> , 1993)	20 g/l Trypton; 2 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O; 1 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O; 8 g/l NaCl; 15 g/l Hefeextrakt →pH 7,0
<b>2 x TY-Medium</b> (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	16 g/l Trypton; 10 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl →pH 7,0
<b>NB-Medium</b> (Roth, 1970)	0,8 % (w/v) Difco™ <i>Nutrient Broth</i> ; 0,5 % (w/v) NaCl

#### 4.2.3 Medienzusätze

Den Wachstumsmedien wurden 0,4 % (w/v) Glucose hinzugefügt. Zusätzlich, um ein selektives Wachstum mithilfe von Resistenzmarkern zu gewährleisten, wurden allen Nährmedien entsprechende Antibiotika zugesetzt (Tabelle 8). Diese wurden als Stammlösungen eingewogen, gelöst und abschließend sterilfiltriert (Whatman® Puradisc filters, Porengröße 0,2 µm, Sigma-Aldrich, Hamburg). Die Lagerung erfolgte in Aliquots bei -20°C. Die Induktion der Expression plasmidkodierter Gene erfolgte durch Zugabe von Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG; Sigma-Aldrich, Hamburg), einem spezifischen Induktor. Dafür wurde eine 1 M Stammlösung in *A. bidest* angesetzt, steril filtriert und in Konzentrationen von 0,1 bis 0,5 mM zur Induktion eingesetzt.

**Tabelle 8:** Konzentration verwendeter Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in <i>A. bidest</i>	100 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in 96 % (v/v) Ethanol	34 µg/ml

#### 4.2.4 Herstellung kompetenter Zellen

Verwendete Geräte

Rotationsschüttler TC-7	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
Röhrchenphotometer PM310	Robert Riele GmbH (Berlin)
Sigma-Laborzentrifuge 3K30	Sigma (Deisenhofen)

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach Sambrook & Russell (2001). Aus einer Übernachtskultur der entsprechenden Zellen wurde eine Übertagkultur in 10 ml LB-Medium 1:100 inokuliert und bei 37°C bis zu einer OD<sub>650</sub> von 0,5 schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in sterile 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 5 Minuten auf Eis gelagert. Die Kultur wurde für 10 Minuten bei 1000 x g (4°C) zentrifugiert und das erhaltene Sediment in 1 ml einer vorgekühlten 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension erneut pelletiert und dann das Zellsediment in 1 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> und 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Es wurden Aliquots zu je 50 µl hergestellt und bei -80°C gelagert.

#### 4.2.5 Kultivierung von Bakterienstämmen

##### Verwendete Geräte

Ultrospec 2000 Spectrophotometer	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Rotationsschüttler TC-7	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
Schüttelinkubator Innova 2300	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
Sorvall RC-5C; Rotor GS3	Sorvall (Bad Homburg)

Kultivierungen zur späteren Isolation von MalE1 (mit oder ohne Linkerregion), MalE2, MalF1G1K1<sub>2</sub>, HPr und der HprK wurden wie in Homburg *et al.* (2017) beschrieben durchgeführt. Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte aerob und je nach Transformant der verwendeten *E. coli* Stämme in unterschiedlichen Wachstumsmedien und unter variierenden Wachstumsbedingungen. Für die Herstellung von Vorkulturen wurden Einzelkolonien von einer Stammplatte in selektivem LB-Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Für die Überexpression von plasmidkodierten Genen wurden die Zellen der Vorkultur zu einer OD<sub>650</sub> von 0,1 in 12 x 500 ml selektivem Medium (4.2.2) inokuliert (Gesamtvolumen 6 Liter). In Schikanekolben wurden die Zellen im Schüttelinkubator bei 30°C (150 rpm) inkubiert. Die Messung der optischen Dichte (OD) des Kulturmediums zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung wurde als Maß für das Zellwachstum herangezogen. Bei einer OD von 0,5 (MalE1, MalE2) oder 0,8 (MalF1G1K1<sub>2</sub>, HPr, HprK) wurden die Zellen durch Zugabe IPTG induziert. Nach weiteren drei Stunden Wachstum bei 30°C (MalE2) oder nach einer Inkubation über Nacht bei 22°C wurden die Zellen für 10 Minuten bei 5000 x g (4°C) pelletiert und direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

#### 4.2.6 Konservierung von Bakterienstämmen

Um Dauerkulturen anzulegen wurden 800 µl einer Übernachtskultur in selektivem NB-Medium (siehe Tabelle 7) mit 70 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt und bei -80°C gelagert (Wheaton®; Zinsser, Frankfurt am Main).

### 4.3 Biochemische Methoden

#### 4.3.1 Reinigung von MalE1

##### verwendete Materialien, Geräte und Puffer

HiTrap Talon	GE Healthcare (Freiburg)
Talon® Metal Affinity Resin	Takara Bio USA, Inc (Mountain View, USA)
Ultrafiltration Discs (10 kDa)	Millipore (Bedford, USA)
Äkta™ Purifier FPLC System	GE Healthcare (Freiburg)
Amicon Stirred Cell Model 8010	Millipore (Bedford, USA)
Branson Sonifier S-250	Heinemann (Schwäbisch Gmünd)
Sigma-Laborzentrifuge 3K30	Sigma (Deisenhofen)
Sorvall ULTRA Pro 80	Sorvall (Bad Homburg)

Puffer A	50 mM MOPS-NaOH, pH 7,0; 10 % (v/v) Glycerin; 300 mM NaCl; 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); Spatelspitze DNase
Puffer B	50 mM MOPS-NaOH, pH 7,0; 10 % (v/v) Glycerin; 500 mM NaCl; 0,1 mM PMSF
Puffer C	50 mM MOPS-NaOH, pH 7,0; 5 % (v/v) Glycerin; 100 mM NaCl; 150 mM Imidazol

MalE1 (mit oder ohne Linkersequenz) wurde in *E. coli* BL21 T1 DE3 überproduziert und das gewonnene Zellpellet (4.2.5) in Puffer A resuspendiert. Anschließend konnten die Zellen über eine Ultraschallbehandlung (9 Minuten, 80 % *output*) aufgeschlossen werden. Einer *low-speed* Zentrifugation für 10 Minuten bei 10 000 x *g*, zur Entfernung von Zelltrümmern und nicht aufgeschlossenen Zellen, folgte eine *high-speed* Zentrifugation für 90 Minuten bei 100 000 x *g*, wodurch cytosolisches MalE1 im Überstand vom Membranpellet getrennt wurde. Die Reinigung von MalE1 erfolgte über den N-terminal fusionierten His<sub>6</sub>-Tag entweder manuell über Säulen mit Co-NTA Agarose oder über ein automatisches System (Äkta™, HiTrap Talon). Die cytosolische Fraktion wurde auf die mit Puffer B äquilibrierte Matrix gegeben. Nach Waschen der Matrix mit 15 Bettvolumen Puffer B und Puffer B versetzt mit 10 mM Imidazol konnte gebundenes MalE1 mit Puffer C eluiert werden. Proteinenthaltene Fraktionen wurden vereinigt, in einer Amicon-Zelle (Membran 10 kDa Ausschluss) auf 2,5 ml konzentriert und abschließend über eine PD-10 Säule (4.3.6) das Imidazol entfernt. Das in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) gepufferte MalE1 wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 4.3.2 Reinigung von MalE2

verwendete Puffer

Puffer E	50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 % (v/v) Glycerin; 500 mM NaCl; 0,1 mM PMSF; 10 mM Imidazol
Puffer F	50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 % (v/v) Glycerin; 100 mM NaCl; 150 mM Imidazol

MalE2 wurde analog zu MalE1 (4.3.1) isoliert. Die Co-NTA Matrix wurde mit Puffer E gewaschen und gebundenes MalE2 mit Puffer F eluiert.

#### 4.3.3 Reinigung von MalF1G1K1<sub>2</sub>

verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und Puffer

n-Dodecyl-β-D-Maltopyranosid (DDM)	Glycon Biochemicals (Luckenwalde)
Talon® Metal Affinity Resin	Takara Bio USA, Inc (Mountain View, USA)
Vivaspin® 4 (100 kDa Ausschluss)	Sartorius (Göttingen)
Branson Sonifier S-250	Heinemann (Schwäbisch Gmünd)
Sigma-Laborzentrifuge 3K30	Sigma (Deisenhofen)
Sorvall ULTRA Pro 80	Sorvall (Bad Homburg)

Puffer G	50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 20 % (v/v) Glycerin; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM EDTA; 2 mM Dithiothreitol (DTT); 0,1 mM PMSF; Spatelspitze DNase
Puffer H	50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 20 % (v/v) Glycerin; 0,1 mM PMSF
Puffer I	50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 20 % (v/v) Glycerin; 0,1 mM PMSF; 0,01 % (w/v) DDM

Die Überproduktion des Transportkomplexes und der verschiedenen Komplexmutanten erfolgte in *E. coli* BL21 T1 DE3. Das erhaltene Zellpellet (4.2.5) wurde in Puffer G resuspendiert. Nach Aufschluss der Zellen über Ultraschall (9 Minuten, 80 % *output*) und einer *low-speed* Zentrifugation (10 Minuten 10 000 x *g*), gefolgt von einer *high-speed* Zentrifugation (90 Minuten 100 000 x *g*) wurde das Membranpellet in Puffer H resuspendiert. Mit einem Glashomogenisator wurde die Membran in kleinere Vesikel zerteilt und diese



(zu  $5 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$  Protein) mit 1,1 % (w/v) DDM für eine Stunde vorsichtig bei  $4^\circ\text{C}$  solubilisiert. Anschließend wurden die durch das Detergens aus der Membran herausgelösten Proteine von der unlöslichen Fraktion durch Ultrazentrifugation bei  $100\,000 \times g$  für 30 Minuten getrennt. Der Überstand wurde sofort mit einer in Puffer I äquilibrierten Talon® Matrix für eine Stunde bei  $4^\circ\text{C}$  schwenkend inkubiert. Nach Waschen der Matrix mit 15 Bettvolumen Puffer I und Puffer I versetzt mit 10 mM Imidazol, konnte MalF1G1K1<sub>2</sub> mit Puffer I versetzt mit 200 mM Imidazol eluiert werden. Das Gesamteluat wurde in einem Vivaspin® 4 (100 kDa) Röhrchen zu einem Volumen von 2,5 ml konzentriert. Es folgte eine Umpufferung mit Puffer I äquilibrierten PD-10 Säulen (4.3.6), anschließendes Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und einer Lagerung bei  $-80^\circ\text{C}$ .

#### 4.3.4 Reinigung von HPr

verwendete Materialien, Geräte und Puffer

Talon® Metal Affinity Resin	Takara Bio USA, Inc (Mountain View, USA)
Vivaspin® 6 (3 kDa Ausschluss)	Sartorius (Göttingen)
Branson Sonifier S-250	Heinemann (Schwäbisch Gmünd)
Sigma-Laborzentrifuge 3K30	Sigma (Deisenhofen)
Sorvall ULTRA Pro 80	Sorvall (Bad Homburg)

Puffer J	50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 % (v/v) Glycerin; 100 mM NaCl; 0,1 mM PMSF; Spatelspitze DNase
Puffer K	50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 % (v/v) Glycerin; 100 mM NaCl; 0,1 mM PMSF
Puffer L	50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 % (v/v) Glycerin; 0,1 mM PMSF

HPr und seine Varianten wurden in *E. coli* BL21 DE3 Fit überproduziert und das erhaltene Zellpellet (4.2.5) in Puffer J resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte über Ultraschall (9 Minuten, 80 % *output*) und das Protein wurde aus der durch verschiedene Zentrifugationsschritte (10 Minuten  $10\,000 \times g$ , 90 Minuten  $100\,000 \times g$ ) erhaltenen cytosolischen Fraktion über Co-NTA Agarose gereinigt. Nach Waschen der Matrix mit 15 Bettvolumen Puffer K und Puffer K mit 20 mM Imidazol wurde gebundenes Protein durch Puffer K versetzt mit 200 mM Imidazol eluiert. Protein enthaltene Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert (Vivaspin® 6, 3 kDa) und über eine mit Puffer L äquilibrierte PD-10 Säule (4.3.6) entsalzen. Abschließend wurde das Protein schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 4.3.5 Reinigung der HPr Kinase

verwendete Materialien, Geräte und Puffer

Ni-NTA Superflow	Qiagen (Hilden)
Talon® Metal Affinity Resin	Takara Bio USA, Inc (Mountain View, USA)
Vivaspin® 6 (3 kDa Ausschluss)	Sartorius (Göttingen)
Branson Sonifier S-250	Heinemann (Schwäbisch Gmünd)
Sigma-Laborzentrifuge 3K30	Sigma (Deisenhofen)
Sorvall ULTRA Pro 80	Sorvall (Bad Homburg)

Puffer M	50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 % (v/v) Glycerin; 150 mM NaCl; Spatelspitze DNase
Puffer N	50 mM Tris-HCl, pH 7,5

$\Delta\text{HprK/P}_{\text{R245A}}$  (keine Dephosphorylierungsfunktion) wurde in *E. coli* NM522 überproduziert (4.2.5) und wie in Chaptal *et al.* (2007) beschrieben, isoliert. Nach der Zellernte wurde das Pellet in Puffer M resuspendiert und die Zellen über Ultraschall (9 Minuten, 80 % *output*) aufgeschlossen. Einer *low-speed* Zentrifugation (10 Minuten bei  $10\,000 \times g$ ) folgte eine *high-speed* Zentrifugation (90 Minuten bei  $100\,000 \times g$ ). Die cytosolische Fraktion wurde auf eine Ni-NTA Agarose, welche zuvor mit Puffer M äquilibriert wurde, gegeben.

Nach Waschen der Matrix mit Puffer M und Puffer M mit 10 mM Imidazol, wurde gebundenes Protein mit Puffer M versetzt mit 150 mM Imidazol eluiert. Protein enthaltene Fraktionen wurden weiter über Talon® Affinitätschromatographie, unter Verwendung der Puffer M und N, gereinigt. Die Elutionsfraktionen wurden über eine Amicon-Zelle (Membran 10 kDa Ausschluss) konzentriert und über eine mit Puffer N äquilierte PD-10 Säule (4.3.6) umgepuffert. Das Protein wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 4.3.6 Umpuffern von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden mithilfe von PD-10 Entsalzungssäulen (GE Healthcare, Freiburg) schnell mit hoher Ausbeute entsalzen, der Puffer getauscht sowie niedermolekulare Verbindungen mit dem Sephadex™ G-25 Medium beseitigt. Die Anwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

#### 4.3.7 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach Bradford, mit Bicinchoninsäure (BCA) oder über UV.

##### Proteinbestimmung nach Bradford

Die Farbveränderung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 beruht auf der Komplexbildung mit vorwiegend basischen und aromatischen Aminosäureseitenketten. Im Laufe dieser Arbeit wurde diese Methode zur qualitativen Abschätzung der Proteinkonzentration (mit Ausnahme von HPr und HprK) während der Proteinreinigung genutzt. Dazu wurden 200 µl Bradford-Reagenz (1:5 in *A. bidest*) mit 5 µl Proteinprobe gemischt und die Intensität der Blaufärbung optisch abgeschätzt.

##### Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

Die Proteinbestimmung der Membranfraktionen sowie der gereinigten HPr-Varianten und der HprK erfolgte mittels Pierce® BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers. Der Proteinnachweis beruht darauf, dass Cystein, Tyrosin und Tryptophan unter geeigneten Bedingungen zweiwertige Kupferionen quantitativ reduzieren können. Die gebildeten einwertigen Kupferionen können dann mit je zwei Bicinchoninsäuremolekülen einen violetten Komplex, mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm, bilden.

##### Proteinbestimmung über UV

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen von MalF1G1K1<sub>2</sub>-Varianten, MalE1-Varianten und MalE2 erfolgte durch Messung der Absorption bei 280 nm mit dem entsprechenden Puffer als Referenz (TECAN infinite® M200, Tecan Group Ltd., Männerdorf, Schweiz). Bei der Berechnung wurden das spezifische Molekulargewicht und der molare Extinktionskoeffizient berücksichtigt.

#### 4.3.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und Puffer

APS	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Bromphenolblau Na-Salz	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Pierce™ Unstained Protein MW Marker	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Drygel Sr. Model SE 1160	Hoefner Scientific Instruments (San Francisco, USA)
Mini Protean II™ Elektrophorese System	Bio-Rad (München)
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad (München)

Sammelgel                      500 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) Rotiphorese® Gel 40

	(37,5:1); 0,1 % (w/v) APS; 0,01 % (v/v) TEMED
Trenngel	150 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS; 12,5- oder 15 % (v/v) Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1); 0,1 % (w/v) APS; 0,01 % (v/v) TEMED
10 x Probenpuffer	500 mM Tris-HCl, pH 6,8; 30 % (v/v) Glycerin; 4 % (w/v) SDS; 5 mM 1,4-Dithiothreitol; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
10 x Laufpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
Fixierlösung	40 % (v/v) 2-Propanol; 10 % (v/v) Essigsäure
Färbelösung	0,01 % (w/v) Coomassie® BrilliantBlue R250; 10 % (v/v) Essigsäure

Die analytische Auftrennung von Proteinen erfolgte als denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Es wurden 12,5- oder 15 %ige SDS-Gele hergestellt und die Proben mit 10fachem Probenpuffer versetzt. Der Lauf erfolgte im Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 120 Volt. Zur Bestimmung des relativen Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine diente ein mitgeführter Proteinstandard, dem His<sub>6</sub>-MalE aus *E. coli* zugesetzt wurde. Die im Trenngel aufgetrennten Proteine konnten dann je nach Verwendungszweck auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (4.3.10), nach einer MANS Markierung unter UV-Licht fotografiert (4.3.18) oder mit Coomassie®-Lösung gefärbt werden. Dafür wurden die Gele 10 Minuten fixiert, angefärbt und abschließend mit 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt. Zu Dokumentationszwecken wurden die SDS-Gele abschließend eingescannt und getrocknet.

#### 4.3.9 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte (siehe SDS-PAGE) und Puffer

Sammelgel	500 mM Tris-HCl, pH 6,8; 5 % (w/v) Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1); 0,1 % (w/v) APS; 0,01 % (v/v) TEMED
Trenngel	150 mM Tris-HCl, pH 8,8; 12,5 % (w/v) Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1); 0,1 % (w/v) APS; 0,01 % (v/v) TEMED
5 x Probenpuffer	300 mM Tris-HCl, pH 6,8; 50 % (v/v) Glycerin; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM Glycin

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird unter Bedingungen durchgeführt, unter denen das Protein seine natürliche Konformation behält. Im Gegensatz zur SDS-PAGE, bei der die Proteine nur anhand ihrer Größe aufgetrennt werden, erfolgt bei der nativen Gelelektrophorese eine Trennung nach Ladung und Größe des Proteins. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die native PAGE hauptsächlich zur Analyse des Phosphorylierungsgrades von HPr herangezogen, wobei die beiden HPr-Formen zu unterschiedlichen Positionen im Gel wandern (Deutscher & Engelmann, 1984). Es wurden dafür 12,5 %ige native Polyacrylamidgele hergestellt und die Proteinlösungen mit nativem Probenpuffer versetzt. Der anschließende Lauf, die Fixierung und die Färbung der Gele erfolgten analog zur SDS-PAGE (4.3.8).

#### 4.3.10 Western-Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen

Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und Puffer

Mouse α-His <sub>5</sub>	Qiagen (Hilden)
Rabbit α-HPr aus <i>B. subtilis</i>	freundlicherweise von J. Deutscher
Western Lightning® Plus-ECL	PerkinElmer (Hamburg)
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare (Freiburg)
Blotting Papier MN 440 B 58 x 60 cm	Macherey-Nagel (Düren)
PROTEAN® Nitrocellulose Transfer Membran	Whatmann Schleicher & Schuell (Dassel)
TRANS-BLOT® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad (München)

Transferpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM Glycin ; 20 % (v/v) Methanol
PonceauS-Lösung	0,2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (v/v) Trichloressigsäure
TNT-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween 20
AP-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub>
Entwicklungspuffer	15 ml AP-Puffer, 160 µl NBT (50 mg/ml in 70 % (v/v) DMF), Spatelspitze BCIP

Zum immunologischen Nachweis wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine 25 Minuten bei 20 Volt auf eine Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,45 µm) transferiert (modifiziert nach Towbin *et al.*, 1979). Zuvor wurden SDS-Gel, Blotting Papier und Membran in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer wurde anschließend durch reversibles Anfärben der Membran mit PonceauS-Lösung kontrolliert und sowohl der Standard als auch die Laufspuren markiert. Es folgte ein mehrmaliges Spülen mit TNT-Puffer. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die unbelegten Protein-Bindestellen durch Zugabe von 10 ml 5 % (w/v) Magermilch/TNT abgesättigt. Zu dieser Lösung wurde ein gegen den His<sub>10</sub>-Tag von MalK1 (Mouse α-His<sub>5</sub>) oder HPr (Rabbit α-HPr aus *B. subtilis*) gerichteter Antikörper in der Verdünnung von 1:2000 bzw. 1:10 000 gegeben und 45 Minuten bei 37°C bzw. über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert.

Für eine Entwicklung des Blots über *Enhanced Chemi Luminescence (ECL)* wurde nach dreimaligem Waschen mit TNT-Puffer der gegen den primären Antikörper gerichtete sekundäre Antikörper (ECL<sup>TM</sup> Anti-Mouse IgG HRP bzw. ECL<sup>TM</sup> Anti-Rabbit IgG HRP) in 10 ml 5 % (w/v) Magermilch/TNT gegeben und für 45 Minuten bei 37°C mit der Membran inkubiert. Nach Wiederholung des Waschschriffs mit TNT-Puffer erfolgte die Entwicklung der Blots in einer Filmkassette mittels des Western Lightning® Plus ECL Kit nach Angaben des Herstellers. Die verstärkte Chemilumineszenz (ECL) ist eine Licht-emittierende Methode, bei der die Peroxidase-gekoppelten Antikörper die Oxidation von Luminol katalysieren. Die Lichtemission liegt bei 428 nm, wodurch eine Schwärzung eines Amersham Hyperfilms erfolgte.

Für eine Entwicklung des Blots über Alkalische Phosphatase wurde nach dreimaligem Waschen mit TNT-Puffer der gegen den primären Antikörper gerichtete sekundäre Antikörper (Anti-Mouse IgG-AP bzw. Anti-Rabbit IgG-AP) in 10 ml 5 % (w/v) Magermilch/TNT gegeben und für 45 Minuten bei 37°C mit der Membran inkubiert. Nach Wiederholung des Waschschriffs mit TNT-Puffer erfolgte die Detektion der indirekt durch die Alkalische Phosphatase markierten Proteine mit einer NBT/BCIP-haltigen Lösung. 5-Brom-4-Chlor-3-Indoylphosphat (BCIP) diente dabei als AP-Substrat, wohingegen Nitroblau-Tetrazoliumsazl (NBT) als Oxidationsmittel fungierte. Die Membran wurde mit Entwicklungspuffer wenige Sekunden bis Minuten bis zum Eintreten einer sichtbaren Farbreaktion inkubiert und anschließend mit *A. bidest* gewaschen.

#### 4.3.11 HPr Phosphorylierung

Die ATP-abhängige Phosphorylierung von HPr und HPr-Varianten an Ser-46 erfolgte durch die HprK nach dem Protokoll von Monedero *et al.* (2001). Dabei wurde ein Ansatz mit einem Volumen von 1 ml bei 37°C unter Anwesenheit von 2,5 mg HPr, 2,5 mg HprK, 5 mM ATP, 20 mM MgCl<sub>2</sub> und 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) für 30 Minuten bei leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen des Ansatzes auf 90°C für 10 Minuten gestoppt und die HprK gefällt. Nach einer kurzen Zentrifugation bei 17 000 x g für 5 Minuten folgte eine Umpufferung über eine PD-10 Säule (4.3.6), welche zuvor mit 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) äquilibriert wurde. Abschließend wurden HPr und Seryl-phosphoryliertes HPr über eine native PAGE (4.3.9) getrennt und die Proteinkonzentration über BCA bestimmt (4.3.7).

#### 4.3.12 Präparation von Proteoliposomen

## Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte

### *E. coli* Total Lipid Extract

Avanti (Alabaster, USA)

Octyl $\beta$ -D-Glucopyranosid	Glycon Biochemicals (Luckenwalde)
Bio-Beads SM-2	Bio-Rad (München)
Bandelin Sonorex Super RK106	Bandelin (Berlin)
Rotationsverdampfer VV-Mikro	Heidolph Instruments (Schwabach)
Sorvall Discovery M120 SE	Sorvall (Bad Homburg)
Zentrifuge 5418	Eppendorf (Hamburg)

Durch Einbau von Membranproteinen in eine Phospholipidmembran von Lipidvesikeln werden Proteoliposomen gebildet. Für die Herstellung der Lipidlösung wurde 1 ml *E. coli* Total Lipid Extract (gelöst in Chloroform) in einem Rotationsverdampfer getrocknet. Zu dem Lipidfilm wurden 1 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 1 % (w/v) Octyl  $\beta$ -D-Glucopyranosid gegeben, mit Stickstoff begast und eine Stunde unter gelegentlichem Vortexen auf Eis inkubiert. Das Lipid wurde anschließend im Wasserultraschallbad der Firma Bandelin für 5 Minuten bei 4°C gelöst. MalF1G1K1<sub>2</sub> und seine Varianten (50  $\mu$ g) und 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) wurden zu 2,5 mg des in Detergens gelösten Lipids gegeben (300  $\mu$ l Ansatz). Proteoliposomen wurden durch Adsorption des Detergens aus dem Proteinkomplex und dem Lipid durch 100 mg Bio-Beads bei 4°C über Nacht gebildet. Nach einer weiteren Inkubation für eine Stunde mit 100 mg neuen Bio-Beads folgte eine Zentrifugation für eine Minute bei 10 000 x *g* um ausgefallenes Protein zu pelletieren. Anschließend wurden die Proteoliposomen bei 200 000 x *g* für 30 Minuten (4°C) zentrifugiert und vorsichtig in 200  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) resuspendiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

#### 4.3.13 Präparation von Nanodiscs

Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte

<i>E. coli</i> Total Lipid Extract	Avanti (Alabaster, USA)
<i>n</i> -Dodecyl $\beta$ -D-Maltosid	Glycon Biochemicals (Luckenwalde)
Bio-Beads SM-2	Bio-Rad (München)
Ni-NTA Superflow	Qiagen (Hilden)
Bandelin Sonorex Super RK106	Bandelin (Berlin)
Rotationsverdampfer VV-Mikro	Heidolph Instruments (Schwabach)
Sorvall Discovery M120 SE	Sorvall (Bad Homburg)
Zentrifuge 5418	Eppendorf (Hamburg)

Puffer O	20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl und 10 % (w/v) <i>n</i> -Dodecyl $\beta$ -D-Maltosid (DDM)
Puffer P	50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl

Nanodiscs sind Protein-Lipid-Partikel, welche aus einer scheibenförmigen Phospholipiddoppelschicht mit darin rekonstituierten Transportkomplexen bestehen (Bayburt & Sligar, 2010). Die rekonstituierten Membranproteine werden durch zwei Kopien eines amphipathischen Gürtelproteins (*MSP*, *membrane scaffold protein*) zusammengehalten, wobei in dieser Arbeit die Variante MSP1E3D1 (Grinkova *et al.*, 2010) verwendet wurde. Die Präparation der Nanodiscs erfolgte nach dem Protokoll von Finkenwirth *et al.* (2015). Für die Herstellung von Nanodiscs wurde das *E. coli* Lipid (Total Lipid Extract) im Rotationsverdampfer getrocknet und im Puffer O im Ultraschallbad (Bandelin) für 5 Minuten gelöst. Transportkomplex, MSP1E3D1 und die Lipidpräparation wurden in einem molaren Verhältnis von 1:4:480 gemixt und für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Für die Assemblierung der Nanodiscs wurden dem Ansatz 1 g Bio-Beads hinzugefügt und diese für 3 Stunden unter leichtem Schwenken bei 4°C inkubiert. Um über den His<sub>10</sub>-Tag an MalK1 die MalF1G1K1<sub>2</sub> enthaltenden Nanodiscs von leeren zu trennen, folgte eine Inkubation des Überstandes mit Ni-NTA Matrix über Nacht bei 4°C. Nach Waschen der Matrix mit Puffer P erfolgte die Elution der Nanodiscs mit Puffer P versetzt mit 250 mM Imidazol. Das Gesamteluat wurde über eine PD-10 Säule entsalzen (50 mM Tris-HCl, pH 7,5) und

Proteinkonzentrationen rekonstituierter Proteine durch Auftragung definierter Mengen gereinigten Transportkomplexes auf einem SDS-Gel und anschließender Pixel-Analyse (GELSCAN 5) bestimmt.

#### 4.3.14 ATPase Assay nach Ames

Verwendete Materialien, Geräte und Puffer

96-Well Mikrotiterplatten

Greiner Bio One GmbH (Frickhausen)

TECAN infinite® M200

Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz)

Lösung A 150 mg Ascorbinsäure in 2,5 ml 1 N HCl

Lösung B 1 % (w/v) Ammoniummolybdatlösung

Lösung C 2 % (v/v) Essigsäure; 2 % (w/v) Natriumcitrat; 2 % (w/v) Natriumarsenat

Die ATPaseaktivität des in DDM solubilisierten (4.3.12) oder in Nanodiscs rekonstituierten (4.3.13) Transportkomplexes kann über die Hydrolyse von ATP, durch die Entstehung von freiem anorganischen Phosphat, indirekt verfolgt werden. Zur Bestimmung wurden 0,5  $\mu$ M Komplexprotein, in An- oder Abwesenheit von 10  $\mu$ M Substrat und 6,8  $\mu$ M MalE1 eingesetzt. Die einzelnen Reaktionsansätze wurden für 3 Minuten bei 37°C vortemperiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM ATP und 5 mM  $MgCl_2$  gestartet. Bei einem Überschuss an  $Mg^{2+}$ -Ionen über ATP werden die Proteoliposomen permeabilisiert, sodass ATP und substratgebundenes MalE1 in das Lumen der Liposomen gelangen können (Liu *et al.*, 1997). Damit ist die Aktivität unabhängig von der Orientierung des Transporters in den Liposomen. Nanodiscs erlauben es Messungen in einer physiologisch natürlicheren Umgebung zu betätigen, da sie eine noch bessere Erreichbarkeit des Transportkomplexes durch die Discs gewährleisten. Zur Bestimmung der Hintergrundaktivität dienten Ansätze mit 2 mM ATP ohne  $MgCl_2$ . Aliquots von 25  $\mu$ l wurden alle 30 Sekunden in Wells einer Mikrotiterplatte gegeben. Diese enthielten 25  $\mu$ l 12 % (w/v) SDS-Lösung zum Abstoppen der Reaktion, durch Denaturierung der Proteine. Die Menge an freigesetztem Phosphat wurde kolorimetrisch mit Ammonium-Molybdat-Komplexen unter Verwendung von  $Na_2HPO_4$  (Ames *et al.*, 2001) bestimmt. Dafür wurden 50  $\mu$ l Lösung A/B (1:1) und nach exakt 5 Minuten 75  $\mu$ l Lösung C, zum Stopp der Farbentwicklung, zu den Ansätzen gegeben. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Ansätze bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen (TECAN). Zur Kalibrierung des Tests wurde eine  $Na_2HPO_4$ -Eichreihe von 0 bis 280 nmol  $P_i$  verwendet.

#### 4.3.15 Inhibierung der ATPaseaktivität durch P-Ser46-HPr

Die ATPase-Messung erfolgte wie unter 4.3.14 beschrieben mit dem Unterschied, dass frisch Seryl-phosphoryliertes HPr (1-40  $\mu$ M) zu den Proteoliposomen oder präparierten Nanodiscs gegeben wurde. Zur abschließenden Bestimmung des Hill-Koeffizienten wurde das Programm GraFit (Erithacus Software Limited, Version 7) genutzt.

#### 4.3.16 Inhibierung der ATPaseaktivität durch Orthovanadat

Die Hemmung der ATPaseaktivität durch Orthovanadat wurde wie in Chen *et al.* (2001) durchgeführt. Dafür erfolgte eine Vorinkubation mit 0,5 mM Orthovanadat für fünf Minuten bei 37°C und die folgende ATPase-Messung wie in 4.3.14 angegeben.

#### 4.3.17 Thrombinverdau

Der N-terminale His<sub>6</sub>-Tag von HPr(T20C) wurde mithilfe des Thrombin CleanCleave™ Kit (Sigma-Aldrich, Hamburg) entfernt. Hierfür wurde das Protein mit 50  $\mu$ l Thrombin-Agarose pro mg Protein in Thrombinpuffer über Nacht bei 4°C schwenkend inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 500 x g konnte der abgespaltene His-Tag über eine Nickel-Affinitätschromatographie entfernt werden. Der Durchlauf und die

Waschfraktionen, welche His-Tag freies HPr(T20C) enthielten, wurden über eine Vivaspin® 6 (3 kDa) konzentriert und die Proteinkonzentration mittels Pierce® BCA Protein Assay Kit (4.3.7) bestimmt.

#### 4.3.18 Quervernetzungsversuche

Innerhalb der Arbeit wurden Quervernetzungsversuche mit CuPhe, BPM, MTS-BP-Bio und MIANS durchgeführt.

##### Kupferphenanthrolin

Quervernetzungsexperimente mit CuPhe wurden wie in Wuttge *et al.* (2016) beschrieben, durchgeführt. Hierbei werden nahe gelegene Cysteine bzw. solche, die während einer Reaktion in unmittelbare Nähe kommen, vernetzt. Zu 1  $\mu$ M Transportkomplex wurden 2 mM ATP und nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur 80  $\mu$ M P-Ser46-HPr(T20C) gegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 5 Minuten (RT) wurde CuPhe (final 10 mM  $\text{KPO}_4$ , pH 7,5; 3 mM  $\text{CuSO}_4$ ; 9 mM 1,10-Phenanthrolin) hinzugegeben und die Ansätze 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion mit 5 mM N-Ethylmaleimid (NEM) gestoppt und die Proben über eine SDS-PAGE (4.3.8) analysiert. Das Quervernetzungsprodukt wurde ausgeschnitten, über Trypsin verdaut (4.3.19) und durch Dr. Sebastian Beck (Humboldt-Universität zu Berlin, Analytische Chemie) massenspektrometrisch analysiert (4.4.4).

##### Benzophenon-4-Maleimid

BPM (Länge 8,6 bis 11,4 Å) bildet stabile Thioetherbindungen mit den Thiolgruppen eines Proteins aus. Unter UV-Bestrahlung wird die Benzophenongruppe in einen hochreaktiven Triplettzustand überführt und baut sich in nahe gelegene C-H oder N-H Bindungen des Interaktionspartners ein (Hermanson, 2013). Quervernetzungsexperimente mit BPM wurden wie in Daus *et al.* (2007) durchgeführt. Dafür wurden His-Tag-freies P-Ser46-HPr(T20C) und HPr(T20C) (4.3.17) (jeweils 300  $\mu$ M) in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) mit 3 mM BPM-Lösung (100 mM BPM in Dimethylsulfoxid) über Nacht auf Eis inkubiert. Unter Rotlicht wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 mM Dithiothreitol (DTT) gestoppt, der Ansatz über eine mit 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) äquilibrierte PD-10 Säule (4.3.6) entsalzen und abschließend in einem Vivaspin® 6 (3 kDa) Röhrchen konzentriert. Für Photocrosslinking-Versuche wurden die BPM-modifizierten Proteine (200  $\mu$ M) mit MalF1G1K1<sub>2</sub> (2,5  $\mu$ M in Detergenzlösung oder Nanodiscs) in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) unter Anwesenheit von 5 mM ATP und 5 mM  $\text{MgCl}_2$  gemischt. Die Reaktion wurde auf Eis durch Bestrahlung für 15 Minuten bei 302 nm (UV-Handlampe Typ HL-15-M, 302 nm, Bachofer GmbH, Weilheim/Teck) bei einem Abstand von 5 cm, gestartet. Quervernetzungsprodukte wurden über SDS-PAGE (4.3.8) und anschließend Western-Blotting und immunologischen Nachweis von HPr und MalK1 (4.3.10) analysiert. Zusätzlich wurde das Quervernetzungsprodukt ausgeschnitten, über Trypsin verdaut (4.3.19) und durch Dr. Sebastian Beck (Humboldt-Universität zu Berlin, Analytische Chemie) massenspektrometrisch analysiert (4.4.4).

##### MTS-BP-Bio

Die Quervernetzungsversuche mit dem trifunktionalen Crosslinker 2-[N<sup>α</sup>-Benzoylbenzoicamido-N<sup>6</sup>-(6-biotinamidocaproyl)-L-lysinylamido]ethyl Methanethiosulfonat (MTS-BP-Bio, Toronto Research Chemicals Inc., North York, Kanada) wurden nach einem abgeänderten Protokoll von Ahrends *et al.* (2006) durchgeführt. In einem ersten Schritt erfolgte die unter Rotlicht durchgeführte Markierung von P-Ser46-HPr(T20C) (600  $\mu$ M) mit 6 mM MTS-BP-Bio in einem finalen Volumen von 100  $\mu$ l für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einer Entsalzung über eine PD-10 Säule (4.3.6) wurde das markierte Protein über eine mit 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) äquilibriertes Vivaspin® 6 (3 kDa) Röhrchen konzentriert. Anschließend erfolgte eine Proteinbestimmung mit BCA (4.3.7). Für den Photocrosslink wurden 2,5  $\mu$ M MalF1G1K1<sub>2</sub>, 1 mM AMP-PNP, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  und 400  $\mu$ M MTS-BP-Bio markiertes phosphoryliertes oder dephosphoryliertes HPr(T20C) zusammengegeben und der Ansatz durch 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 0,02 % (w/v) DDM auf ein Volumen von 50  $\mu$ l gebracht. Die Reaktion wurde durch eine Bestrahlung bei 366 nm (UV-Handlampe Typ HL-15-M, 366 nm, Bachofer GmbH,

Weilheim/Teck) für 30 Minuten mit einem Abstand von 5 cm gestartet und die Proben anschließend über eine SDS-PAGE (4.3.8) analysiert. Die entstandenen Quervernetzungsprodukte wurden mit einem Skalpell aus dem SDS-Gel geschnitten und ein In-Gel oder In-Lösung Trypsinverdau durchgeführt (4.3.19). Das in der Vakuumzentrifuge erhaltene Pellet wurde in 100 µl 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) resuspendiert und auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Strep-Tactin® Sepharose® (IBA Lifesciences, Göttingen) gegeben. Es folgte eine Inkubation von 2,5 Stunden unter leichtem Schwenken bei 4°C und das anschließende Waschen der Säule mit 15 Bettvolumen 50 mM Tris-HCl (pH 7,5). Nach der Elution des Peptids mit Elutionspuffer (5 mM Desthiobiotin in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) wurde die Probe in 50 mM Ammoniumacetat umgepuffert (PD-10, 4.3.6) und die Eluate abschließend eingetrocknet. Die massenspektrometrische Analyse (4.4.4) der Peptide erfolgte durch Dr. Sebastian Beck (Humboldt-Universität zu Berlin, Analytische Chemie).

## MIANS

Nach Markierung von P-Ser46-HPr(T20C) mit BPM oder MTS-BP-Bio wurde jeweils eine Kontrollmarkierung mit 2-(4'-Maleimidylanilino)-Naphthalene-6-Sulfonsäure (MIANS) durchgeführt. MIANS bindet über seine Maleimid-Kopplungsgruppe an Thiolgruppen der Cysteine und kann aufgrund seiner fluorophoren Eigenschaften unter UV-Licht detektiert werden. Dafür wurden 20 µM des zu untersuchenden Proteins mit 20 µM MIANS für 1 Stunde schwenkend bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung des ungebundenen Labels wurde der Ansatz über eine mit 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) äquilibrierte PD-10 Säule umgepuffert und die Eluate über ein 15 %iges SDS-Gel analysiert. Das Gel wurde nach dem Lauf unter UV-Licht (UV Transilluminator UVT-20M, Herolab, Wiesloch) fotografiert und abschließend wie unter 4.3.8 beschrieben fixiert, gefärbt und entfärbt.

### 4.3.19 Limitierter Trypsinverdau

#### Verwendete Lösungen

Lösung D	50 mM Ammoniumbicarbonat, 50 % (v/v) Acetonitril
Lösung E	Lösung A; 20 mM DTT
Lösung F	5 % (v/v) Ameisensäure in 60 % (v/v) Acetonitril
Trypsin	12,5 ng/µl in 50 mM Essigsäure

Der enzymatische Verdau eines Proteins mit spezifisch schneidenden Proteasen, wie zum Beispiel Trypsin oder Endoprotease Glu-C, führt zu einer definierten Anzahl von Peptiden mit charakteristischer Masse, die massenspektrometrisch analysiert und anschließend zur Identifikation des Proteins verwendet werden können. Der In-Gel-Verdau erfolgte wie in Heuveling *et al.* (2014) angegeben. Dafür wurde die Bande des Quervernetzungsproduktes (4.3.18) ausgeschnitten und in etwa 1 mm große Stücke zerkleinert. Zur Entfärbung der Banden wurde dreimal mit 300 µl Lösung D für 30 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Durch Zugabe von Lösung E und einer Inkubation von einer Stunde bei 37°C wurden die im Protein vorhandenen Cysteine reduziert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, folgte ein dreimaliges Waschen mit Lösung D. Durch Zugabe von 100 µl 100 % (v/v) Acetonitril werden die proteinhaltigen Gelstücke 10 Minuten entwässert und nach Verwerfen des Überstandes 5 Minuten in der Vakuumzentrifuge (Savant™ SpeedVac™ DNA 110, Savant Instruments, Farmingdale, USA) getrocknet. Innerhalb einer 45-minütigen Inkubation (4°C) mit 2 µg Trypsin (*Sequencing Grade Modified Trypsin*, Promega Corporation, Mannheim) werden die Gelstücke rehydriert und dabei die Protease mit aufgenommen. Nach Zugabe von 100 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat erfolgte eine weitere Inkubation bei 37°C (300 rpm) für 12-16 Stunden. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß und auf die Gelstücke dreimal 50 µl Lösung F gegeben. Die Verwendung von Acetonitril verhindert hierbei die Adsorption von Peptiden an die Oberflächen der Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen (Erdjument-Bromage *et al.*, 1998). Jeweils nach einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Überstände vereinigt und in der Vakuumzentrifuge konzentriert.



Für einen In-Lösung Trypsinverdau wurde der Quervernetzungsansatz in der Vakuumzentrifuge konzentriert und in 50 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat resuspendiert. Nach Zugabe von 200 ng Trypsin und bei einigen Ansätzen zusätzlich 300 ng Endoproteinase Glu-C (Roche), folgte eine 12-stündige Inkubation bei 37°C (300 rpm). Am folgenden Tag wurde, zur Inaktivierung des Enzyms, der Ansatz für 10 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet.

#### 4.3.20 Papierchromatographie

##### Verwendete Lösung

Tollens-Reagenz	50 ml 0,1 M Silbernitrat, tröpfchenweise Zugabe von 10 % Ammonium bis zur Auflösung des braunen Silber(I)-oxid
-----------------	--

Das kommerziell bei Sigma-Aldrich zu erwerbende D-(+)-Maltosemonohydrat (63418) hat einen Reinheitsgehalt von  $\geq 99\%$  (Verunreinigung  $\leq 1,0\%$  Maltotriose). Das Ziel der Papierchromatographie war es, Maltose ohne jegliche Verunreinigungen zu erhalten. Dafür wurden fünf Punkte mit jeweils 10 µl 100 mM der käuflich erworbenen Maltose auf Chromatographie-Papier (MN 218, 58 x 60 cm, Macherey-Nagel, Düren) getropft. Als Referenz wurden auf einem extra Papier 10 µl 100 mM Maltose und 100 mM Maltotriose (443713) gegeben. Die Zucker wurden durch eine aufsteigende Chromatographie für 60 Stunden mit einem Laufmittel aus *n*-Butanol:Ethanol:Wasser (3:2:1,5, v/v/v) getrennt. Anschließend wurden die Chromatogramme getrocknet und das Referenz-Chromatogramm mithilfe von Tollens-Reagenz für 5 Minuten bei 105°C sichtbar gemacht. Der Bereich auf gleicher Höhe zur gefärbten Maltose in der Referenz wurde ausgeschnitten und die nachgereinigte Maltose mithilfe der Methode von Dent (1947) herausgelöst. Dafür wurde der Papierstreifen zwischen zwei Glasobjektträgern in eine Petrischale gestellt. Das in der Petrischale enthaltende Wasser steigt durch die Kapillarkräfte zwischen den Objektträgern nach oben und wäscht in 23 Stunden tröpfchenweise den Zucker in ein Becherglas (6 ml) aus. Verdunstung wurde durch einen äußeren, größeren Behälter verhindert. Nach diesem Schritt wurde der Papierstreifen getrocknet und mit Tollens-Reagenz für 5 Minuten bei 105°C das Herauslösen des Zuckers durch Färbung des Streifens überprüft. Das erhaltene Eluat (6 ml) wurde in einer Vakuumzentrifuge (Savant™ SpeedVac™ DNA 110, Savant Instruments, Farmingdale, USA) bis auf 100 µl konzentriert. Um die ungefähre Konzentration der nachgereinigten Maltose zu bestimmen, wurde eine Dünnschichtchromatographie, nach dem Protokoll von Müller & Sinn (1977), mit dem gleichen Laufmittel und definierten Mengen von Maltose als Referenz, durchgeführt. Die Zucker wurden durch Färbung des getrockneten Chromatogramms mit Methanol/Schwefelsäure (49:1, v/v) für 5 Minuten bei 180°C sichtbar gemacht.

#### 4.3.21 Substratbindungsassay mittels radioaktiv markierter Substrate

Die Bestimmung der Bindungskonstanten von MalE1 für Maltose und Maltotetraose erfolgte nach einem Protokoll von Richarme & Kepes (1983). Die verwendeten Substratkonzentrationen lagen im Bereich von 0,1 bis 50 µM. Standardansätze von 100 µl setzten sich aus 2 µM MalE1 zusammen und wurden für eine Minute bei 30°C inkubiert, bevor radioaktiv markiertes Substrat zugesetzt wurde. Nach einer weiteren Inkubation für eine Minute bei 30°C wurde die Reaktion schließlich durch Zugabe von 2 ml einer eisgekühlten Ammoniumsulfatlösung gestoppt und der Ansatz sofort mithilfe eines Vakuum-Filtrationsgeräts bei 20 Torr filtriert (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA). Nach einem Waschschrift des Filters mit 5 ml Ammoniumsulfatlösung und 5 ml *A. bidest* erfolgte die Trocknung der Filter, bevor diese mit 4,5 ml Szintillationslösung (Zinsser Analytic, Frankfurt, Deutschland) versetzt wurden und die verbleibende Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraFit 5.

Zur Bestimmung der Affinitäten des Bindeproteins gegenüber verschiedener Substrate wurden Kompetitionsstudien mithilfe eines Präzipitationsexperiments nach einem Protokoll von Richarme & Kepes

(1983) durchgeführt. Hierfür wurde das Bindeprotein (50  $\mu\text{M}$ ) vor der Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Maltotetraose zunächst eine Minute mit den zu testenden Zuckern in einer Konzentration von jeweils 10 mM bei 30°C inkubiert. Die folgenden Schritte wurden, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, durchgeführt.

## 4.4 Biophysikalische Methoden

### 4.4.1 Kristallisation von MalE1

Kristallisierungen von MalE1 erfolgten durch Dr. Martin Bommer (Institut für Biologie/Strukturbiologie und Biochemie, Prof. Dobbek, Humboldt-Universität zu Berlin) nach dem Protokoll aus Homburg *et al.* (2017). Für die Kristallisierungen wurde MalE1 auf 60 mg/ml konzentriert und in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) aufgenommen. Substratgebundene und freie Kristallisationsformen wuchsen unter gleichen Bedingungen. Es wurde die *sitting drop* Dampfdiffusionsmethode bei 18°C angewendet. Dafür wurden gleiche Volumen an Proteinlösung mit Reservoirlösung (0,1 M Na-HEPES, pH 7,0; 20-25 % Jeffamine ED2003, pH 7,0) versetzt. Zusätzlich zur Protein- und Kristallisationslösung enthielten substratbeladene Ansätze 5 mM Maltotetraose/100 mM LiCl, 5 mM Maltotriose/10 mM  $\text{SrCl}_2$ , 5 mM  $\alpha$ -Cyclodextrin, 5 mM  $\beta$ -Cyclodextrin/1 % (w/v) Polyethylen Glycol 3350 oder 5 mM  $\gamma$ -Cyclodextrin. Kristalle welche  $\alpha$ -Cyclodextrin und Maltotriose als Ligand enthielten, wuchsen nur, nachdem nach einigen Wochen Vorinkubation Fragmente von  $\beta$ -Cyclodextringebundenen Kristallen zum Kristallisationsansatz gegeben wurden. Kristalle mit Maltotetraose wurden für 1 Minute in einer Lösung aus 20 % (w/v) Ethylen Glycol getränkt und abschließend in flüssigen Stickstoff getaucht. Bei allen anderen Kristallen war es nicht erforderlich einen Kälteschutz zu verwenden: Die 0,5 mm langen rechteckigen Kristalle wurden in einer Nylonschleife so montiert, dass 0,2 mm des Kristalls aus der Schleife ragten und frei von Kristallisationslösung, welche Eiskristalle hätte formen können, in den Stickstoffstrahl gelangte. Dieser Abschnitt wurde dann zur Datensammlung bei -173°C genutzt. Details zur abschließenden Erstellung der Strukturmodelle sind in Homburg *et al.* (2017) angegeben und wurden durch Dr. Martin Bommer angewandt.

### 4.4.2 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Das thermodynamische Verfahren basiert auf der direkten Messung der Wärme, die bei einer Komplexierung des Bindeproteins mit einem Substrat abgegeben oder aufgenommen wird (Wiseman *et al.*, 1989; Velázquez-Campoy *et al.*, 2004). Bindungsaffinitäten von MalE1 und MalE2 für die jeweiligen Substrate wurden durch ein VP-ITC Microcalorimeter (MicroCal, Northampton, USA) bei 20°C wie in Bulut *et al.* (2012) bestimmt. Dafür wurde Protein in einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  (50 mM Tris-HCl, pH 7,5) in die Messzelle pipettiert und in 30 Schritten gegen 10  $\mu\text{l}$  Substrat (6 mM) in 4 Minuten Intervallen titriert. Bei einer Wechselwirkung zwischen MalE1 und einem der Substrate, wurde der gemessene Temperaturunterschied im Vergleich zu einer Referenzzelle durch eine Heizleistung des VP-ITC Mikrokalorimeters ausgeglichen. Die so erhaltenen Peaks wurden integriert und die resultierenden Reaktionswärmen gegen das molare Verhältnis zwischen Substrat und Bindeprotein aufgetragen. Die Dissoziationskonstanten der Reaktion wurden abschließend aus dem Anstieg des linearen Bereichs der unter Verwendung der *single-binding site model* gefitteten Kurve mithilfe der Origin5 Software (MicroCal Software, Northampton, USA) bestimmt.

### 4.4.3 Fluoreszenzspektroskopie

Alle Fluoreszenzspektren wurden am FluoroMax®-4 Spektrometer (Horiba Scientific, Bensheim) unter Verwendung von 3,5 ml Quarzküvetten der Firma Hellma Analytics (Müllheim) aufgenommen.

Die Bestimmung der Tryptophanfluoreszenz von MalE1 (6 Tryptophane) erfolgte wie in Pajatsch *et al.* (1998) angegeben. Die drei aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin haben fluoreszierende Eigenschaften. Den größten Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten eines Proteins hat Tryptophan, mit einem Absorptionsmaximum bei 280 nm (Lakowicz, 1992). Die Tryptophane können durch Komplexierung mit einem Substrat und der daraus resultierenden Konformationsänderung partiell verdeckt werden. Das daraus

resultierende veränderte Emissionsverhalten kann sich in einer Verminderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz und/oder einer Verschiebung des Emissionsmaximums äußern (Miller *et al.*, 1983; Martineau *et al.*, 1990). Es wurden Emissionsspektren (Anregungswellenlänge 280 nm) bei 21°C zwischen 305 und 450 nm (5 nm Schlitzbreite) in 200 µl 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), welches auch als Referenz diente, aufgenommen. Zu 2 µM MalE1 wurde in kleinen Volumina eine Serie von Substratkonzentrationen (0,1 µM-1 mM) gegeben und der Shift des Emissionsmaximums gegen kleinere Wellenlängen sowie das Fluoreszenzquenching bestimmt. Die Daten wurden in GraFit (Erithacus Software Limited, Version 7) ausgewertet.

Mithilfe des ATP-Analogons 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)Adenosin 5'-Triphosphat (TNP-ATP) wurden ATP-Bindungsstudien von MalF1G1K1<sub>2</sub> unter An- oder Abwesenheit des Regulators P-Ser46-HPr durchgeführt. TNP-ATP ist ein Fluorophor bei dem am Ribosering des ATP eine TNP-Gruppe kovalent substituiert ist (Hiratsuka, 1982). Das Messprinzip besteht darin, dass durch die Bindung des Fluorophors in die ATP-Bindetasche von MalK1 die Umgebung der TNP-Gruppe im Vergleich zu in Lösung befindlichem TNP-ATP hydrophober wird und daraus eine Verstärkung des Fluoreszenz-Emissionssignals bei 535 nm resultiert (Hiratsuka, 1976 und 1982). Die Fluoreszenzmessungen wurden wie in Bao & Duong (2013) angegeben, durchgeführt. Die Bindung von TNP-ATP (2-16 µM) an 0,5 µM MalF1G1K1<sub>2</sub> Nanodiscs (4.3.13) in Anwesenheit von 6,8 µM MalE1/10 µM Maltotetraose wurde bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm (5 nm Schlitzbreite) aufgenommen. Vor jeder Messung erfolgte eine 3-minütige Inkubation mit TNP-ATP bei Raumtemperatur. Für jede TNP-ATP Konzentration wurde die Fluoreszenz (bei 535 nm) in Anwesenheit von MalF1G1K1<sub>2</sub> Nanodiscs gegen die in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) korrigiert. Die erhaltene Fluoreszenzintensität ( $F_i$ ) wurde als Funktion der TNP-ATP Konzentration ( $C$ ) aufgetragen und nach folgender Gleichung angepasst:

$$F_i = F_{max} \times \frac{[C]}{[C] + K_d}$$

$F_{max}$  ist die maximal abgezogene Fluoreszenz bei sättigenden Mengen an TNP-ATP und  $K_d$  die Gleichgewichtsdissoziationskonstante von TNP-ATP für MalF1G1K1<sub>2</sub>.

#### 4.4.4 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse der Quervernetzungsprodukte wurde durch Dr. Sebastian Beck (Humboldt-Universität zu Berlin, Analytische Chemie) durchgeführt. Die getrockneten Trypsinverdau Ansätze (4.3.19) der Quervernetzungsprodukte als auch die Kontrollen von MalF1, MalG1, MalK1 und HPr(T20C) wurden dafür in einem Lösungsmittel aus 10 µl 50 % (v/v) Acetonitril, 2 % (v/v) Ameisensäure und 48 % Wasser gelöst und mit dem gleichen Volumen einer gesättigten 2,5-Dihydroxybenzoesäure (gelöst im Lösungsmittel) gemischt. 1,5 µl dieses Ansatzes wurden auf rostfreie Stahlplatten getropft und an einem MALDI Orbitrap XL (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) mit einer spektralen Auflösung von 60 000 gemessen.

## Literaturverzeichnis

- Acedo-Félix, E.** & **Pérez-Martínez, G.** (2003) Significant differences between *Lactobacillus casei subsp. casei* ATCC 393T and a commonly used plasmid-cured derivative revealed by a polyphasic study. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 67-75.
- Ahrends, R.**; **Kosinski, J.**; **Kirsch, D.**; **Manelyte, L.**; **Giron-Monzon, L.**; **Hummerich, L.**; **Schulz, O.**; **Spengler, B.**; **Friedhoff, P.** (2006) Identifying an interaction site between MutH and the C-terminal domain of MutL by crosslinking, affinity purification, chemical coding and mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* 34: 3169-80.
- Ambudkar, S.V.**; **Kim, I.W.**; **Xia, D.**; **Sauna, Z.E.** (2006) The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. *FEBS Lett* 580: 1049-55.
- Ames, G.F.-L.**; **Nikaido, K.**; **Wang, I.X.**; **Liu, P.-Q.**; **Liu, C.E.**; **Hu, C.** (2001) Purification and characterization of the membrane-bound complex of an ABC transporter, the histidine permease. *J Bioenerg Biomembr* 33: 79-92.
- Andersson, U.**; **Molenaar, D.**; **Radström, P.**; **de Vos, W.M.** (2005) Unity in organisation and regulation of catabolic operons in *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* and *Listeria monocytogenes*. *Syst Appl Microbiol* 28: 187-95.
- Audette, G.F.**; **Engelmann, R.**; **Hengstenberg, W.**; **Deutscher, J.**; **Hayakawa, K.**; **Quail, J.W.**; **Delbaere, L.T.** (2000) The 1.9 Å resolution structure of phospho-serine 46 HPr from *Enterococcus faecalis*. *J Mol Biol* 303: 545-53.
- Austermuhle, M.I.**; **Hall, J.A.**; **Klug, C.S.**; **Davidson, A.L.** (2004) Maltose-binding protein is open in the catalytic transition state for ATP hydrolysis during maltose transport. *J Biol Chem* 279: 28243-50.
- Bao, H.** & **Duong, F.** (2013) Phosphatidylglycerol directs the binding and inhibitory action of EIIA<sup>Glc</sup> on the maltose transporter. *J Biol Chem* 288: 23666-74.
- Barabote, R.D.** & **Saier, M.H., Jr.** (2005) Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 608-34.
- Bäuerl, C.**; **Pérez-Martínez, G.**; **Yan, F.**; **Polk, D.B.**; **Monedero, V.** (2010) Functional analysis of the p40 and p75 proteins from *Lactobacillus casei* BL23. *J Mol Microbiol Biotechnol* 19: 231-41.
- Bayburt, T.H.** & **Sligar, S.G.** (2010) Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS Lett* 584: 1721-7.
- Berger, E.A.** (1973) Different mechanisms of energy coupling for the active transport of proline and glutamine in *Escherichia coli*. *P Natl Acad Sci USA* 70: 1514-8.
- Berger, E.A.** & **Heppel, L.A.** (1974) Different mechanisms of energy coupling for the shock-sensitive and shock-resistant amino acid permeases of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 249: 7747-55.
- Berntsson, R.P.**; **Smits, S.H.**; **Schmitt, L.**; **Slotboom, D.J.**; **Poolman, B.** (2010) A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett* 584: 2606-17.
- Biasini, M.**; **Bienert, S.**; **Waterhouse, A.**; **Arnold, K.**; **Studer, G.**; **Schmidt, T.**; **Kiefer, F.**; **Gallo Cassarino, T.**; **Bertoni, M.**; **Bordoli, L.**; **Schwede, T.** (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 42 (Web Server issue): W252-8.
- Bidossi, A.**; **Mulas, L.**; **Decorosi, F.**; **Colomba, L.**; **Ricci, S.**; **Pozzi, G.**; **Deutscher, J.**; **Viti, C.**; **Oggioni, M.R.** (2012) A functional genomics approach to establish the complement of carbohydrate transporters in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* 7: e33320.

- Biemans-Oldehinkel, E.; Doeven, M. K.; Poolman, B.** (2006) ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett* 580: 1023-35.
- Bohl, E. & Boos, W.** (1997) Quantitative analysis of binding protein-mediated ABC transport systems. *J Theor Biol* 186: 65–74.
- Böhm, A.; Diez, J.; Diederichs, K.; Welte, W.; Boos, W.** (2002) Structural model of MalK, the ABC subunit of the maltose transporter of *Escherichia coli*: implications for *mal* gene regulation, inducer exclusion, and subunit assembly. *J Biol Chem* 277: 3708-17.
- Böhm, S.; Licht, A.; Wuttge, S.; Schneider, E.; Bordignon, E.** (2013) Conformational plasticity of the type I maltose ABC importer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 5492-7.
- Boos, W. & Shuman, H.** (1998) Maltose/Maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 204-29.
- Bordignon, E.; Grote, M.; Schneider, E.** (2010) The maltose ATP-binding cassette transporter in the 21st century-towards a structural dynamic perspective on its mode of action. *Mol Microbiol* 77: 1354-66.
- Brochu, D. & Vadeboncoeur, C.** (1999) The HPr(Ser) kinase of *Streptococcus salivarius*: purification, properties, and cloning of the *hprK* gene. *J Bacteriol* 181: 709-17.
- Buckstein, M.H.; He, J.; Rubin, H.** (2008) Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190: 718-26.
- Bulut, H.; Moniot, S.; Licht, A.; Scheffel, F.; Gathmann, S.; Saenger, W.; Schneider, E.** (2012) Crystal structures of two solute receptors for L-cystine and L-cysteine, respectively, of the human pathogen *Neisseria gonorrhoeae*. *J Mol Biol* 415: 560-72.
- Cai, H.; Rodríguez, B.T.; Zhang, W.; Broadbent, J.R.; Steele, J.L.** (2007) Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology* 153: 2655-65.
- Callaghan, R.** (2015) Providing a molecular mechanism for P-glycoprotein; why would I bother? *Biochem Soc Trans* 43: 995-1002.
- Cao, Y.; Jin, X.; Levin, E.J.; Huang, H.; Zong, Y.; Quick, M.; Weng, J.; Pan, Y.; Love, J.; Punta, M.; Rost, B.; Hendrickson, W.A.; Javitch, J.A.; Rajashankar, K.R.; Zhou, M.** (2011) Crystal structure of a phosphorylation-coupled saccharide transporter. *Nature* 473: 50-4.
- Chaptal, V.; Vincent, F.; Gueguen-Chaignon, V.; Monedero, V.; Poncet, S.; Deutscher, J.; Nessler, S.; Morera, S.** (2007) Structural analysis of the bacterial HPr kinase/phosphorylase V267F mutant gives insights into the allosteric regulation mechanism of this bifunctional enzyme. *J Biol Chem* 282: 34952–57.
- Charrier, V.; Deutscher, J.; Galinier, A.; Martin-Verstraete, I.** (1997) Protein phosphorylation chain of a *Bacillus subtilis* fructose-specific phosphotransferase system and its participation in regulation of the expression of the *lev* operon. *Biochemistry* 36: 1163-72.
- Chen, J.; Sharma, S.; Quijcho, F.A.; Davidson, A.L.** (2001) Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1525-30.
- Chen, J.; Lu, G.; Lin, J.; Davidson, A.L.; Quijcho, F.A.** (2003) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell* 12: 651-61.

- Chen, J.** (2013) Molecular mechanism of the *Escherichia coli* maltose transporter. *Curr Opin Struct Biol* 23: 492-8.
- Chen, S.; Oldham, M.L.; Davidson, A.L.; Chen, J.** (2013) Carbon catabolite repression of the maltose transporter revealed by X-ray crystallography. *Nature* 499: 364–8.
- Cockburn, D.W.; Orlovsky, N.I.; Foley, M.H.; Kwiatkowski, K.J.; Bahr, C.M.; Maynard, M.; Demeler, B.; Koropatkin, N.M.** (2015) Molecular details of a starch utilization pathway in the human gut symbiont *Eubacterium rectale*. *Mol Microbiol* 95: 209–230.
- Cuneo, M.J.; Changela, A.; Beese, L.S.; Hellinga, H.W.** (2009) Structural adaptations that modulate monosaccharide, disaccharide, and trisaccharide specificities in periplasmic maltose-binding proteins. *J Mol Biol* 389: 157–166.
- Cvitkovitch, D.G.; Boyd, D.A.; Thevenot, T.; Hamilton, I.R.** (1995) Glucose transport by a mutant of *Streptococcus mutans* unable to accumulate sugars via the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *J Bacteriol* 177: 2251-8.
- Dassa, E. & Bouige, P.** (2001) The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res Microbiol* 152: 211-29.
- Dassa, E.** (2011) Natural history of ABC systems: not only transporters. *Essays Biochem* 50: 19-42.
- Daus, M.L.; Berendt, S.; Wuttge, S.; Schneider, E.** (2007) Maltose binding protein (MalE) interacts with periplasmic loops P2 and P1, respectively, of the MalFG subunits of the maltose ATP-binding cassette transporter (MalFGK<sub>2</sub>) from *Escherichia coli*/*Salmonella* during the transport cycle. *Mol Microbiol* 66: 1107-22.
- Daus, M.L.; Grote, M.; Schneider, E.** (2009) The MalF P2 loop of the ATP-binding cassette transporter MalFGK<sub>2</sub> from *E. coli* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium interacts with maltose binding protein (MalE) throughout the catalytic cycle. *J Bacteriol* 191: 754-61.
- Davidson, A.L.; Shuman, H.A.; Nikaido, H.** (1992) Mechanism of maltose transport in *E. coli*: Transmembrane signaling by periplasmic binding proteins. *Proc Natl Acad Science USA* 89: 2360-4.
- Davidson, A.L. & Chen, J.** (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem.* 73: 241-68.
- Davidson, A.L.; Dassa, E.; Orelle, C.; Chen, J.** (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 317-64.
- Dawson, R.J. & Locher, K.P.** (2006) Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* 443: 180-5.
- Dawson, R.J.; Hollenstein, K.; Locher, K.P.** (2007) Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism. *Mol Microbiol* 65: 250-7.
- Dawson, R.J. & Locher, K.P.** (2007) Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* in complex with AMP-PNP. *FEBS Lett* 581: 935-8.
- Dean, D.A.; Reizer, J.; Nikaido, H.; Saier, M.H., Jr.** (1990) Regulation of the maltose transport system of *Escherichia coli* by the glucose-specific enzyme III of the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system. Characterization of inducer exclusion-resistant mutants and reconstitution of inducer exclusion in proteoliposomes. *J Biol Chem* 265: 21005-10.
- Dent, C.E.** (1947) The amino-aciduria in Fanconi syndrome. A study making extensive use of techniques based on paper partition chromatography. *Biochem J* 41: 240-53.

- De Vrese, M.** & Schrezenmeir, J. (2008) Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 111: 1-66.
- Deutscher, J.** & Engelmann, R. (1984) Purification and characterization of an ATP-dependent protein kinase from *Streptococcus faecalis*. *FEMS Microbiol Lett* 23: 157-62.
- Deutscher, J.;** Kessler, U.; Alpert, C.A.; Hengstenberg, W. (1984) Bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: P-Ser-HPr and its possible regulatory function? *Biochemistry* 23: 4455-60.
- Deutscher, J.;** Reizer, J.; Fischer, C.; Galinier, A.; Saier, M.H. Jr.; Steinmetz, M. (1994) Loss of protein kinase-catalyzed phosphorylation of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system, by mutation of the ptsH gene confers catabolite repression resistance to several catabolic genes of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 176: 3336-44.
- Deutscher, J.;** Francke, C.; Postma, P.W. (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 939-1031.
- Diederichs, K.** & Karplus, P.A. (1997) Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nature Struct Biol* 4: 269-75.
- Dippel, R.** & Boos, W. (2005) The maltodextrin system of *Escherichia coli*: metabolism and transport. *J Bacteriol* 187: 8322-31.
- Domínguez Rubio, A.P.;** Martínez, J.H.; Martínez Casillas, D.C.; Coluccio Leskow, F.; Piuri, M.; Pérez, O.E. (2017) *Lactobacillus casei* BL23 Produces Microvesicles Carrying Proteins That Have Been Associated with Its Probiotic Effect. *Front Microbiol* 8: 1783.
- Doyle, L.A.;** Yang, W.; Abruzzo, L.V.; Krogmann, T.; Gao, Y.; Rishi, A.K.; Ross, D.D. (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15665-70.
- Eitinger, T.;** Rodionov, D. A.; Grote, M. und Schneider, E. (2011) Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions. *FEMS Microbiol Rev* 35: 3-67.
- Erdjument-Bromage, H.;** Lui, M.; Lacomis, L.; Grewal, A.; Annan, R.S.; McNulty, D.E.; Carr, S.A.; Tempst, P. (1998) Examination of micro-tip reversed-phase liquid chromatographic extraction of peptide pools for mass spectrometric analysis. *J Chromatogr A* 826: 167-81.
- Evdokimov, A.G.;** Anderson, D.E.; Routzahn, K.M.; Waugh, D.S. (2001) Structural basis for oligosaccharide recognition by *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. *J Mol Biol* 305: 891-904.
- Fenyvesi, É.;** Vikmon, M.; Szenté, L. (2016) Cyclodextrins in Food Technology and Human Nutrition: Benefits and Limitations. *Crit Rev Food Sci Nutr* 56: 1981-2004.
- Ferreira, M.J.** & Sá-Nogueira, I. (2010) A multitask ATPase serving different ABC-type sugar importers in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 192: 5312-8.
- Fioulaine, S.;** Morera, S.; Poncet, S.; Monedero, V.; Gueguen-Chaignon, V.; Galinier, A.; Janin, J.; Deutscher, J.; Nessler, S. (2001) X-ray structure of HPr kinase: a bacterial protein kinase with a P-loop nucleotide-binding domain. *EMBO J* 20: 3917-27.
- Fioulaine, S.;** Morera, S.; Poncet, S.; Mijakovic, I.; Galinier, A.; Janin, J.; Deutscher, J.; Nessler, S. (2002) X-ray structure of a bifunctional protein kinase in complex with its protein substrate HPr. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13437-41.

- Finkenwirth, F.;** Sippach, M.; Landmesser, H.; Kirsch, F.; Ogienko, A.; Grunzel, M.; Kiesler, C.; Steinhoff, H.J.; Schneider, E.; Eitinger, T. (2015) ATP-dependent conformational changes trigger substrate capture and release by an ECF-type biotin transporter. *J Biol Chem* 290: 16929-42.
- Fujita, Y. & Miwa, Y.** (1994) Catabolite repression of the *Bacillus subtilis gnt* operon mediated by the CcpA protein. *J Bacteriol* 176: 511-3.
- Fukami-Kobayashi, K.;** Tateno, Y.; Nishikawa K (1999) Domain dislocation: a change of core structure in periplasmic binding proteins in their evolutionary history. *J Mol Biol* 286: 279-90.
- Galinier, A.;** Kravanja, M.; Engelmann, R.; Hengstenberg, W.; Kilhoffer, M.C.; Deutscher, J.; Haiech, J. (1998) New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1823-8.
- Galinier, A.;** Deutscher, J.; Martin-Verstraete, I. (1999) Phosphorylation of either *crh* or HPr mediates binding of CcpA to the *Bacillus subtilis xyn cre* and catabolite repression of the *xyn* operon. *J Mol Biol* 286: 307-14.
- Gauthier, M.;** Brochu, D.; Eltis, L.D.; Thomas, S.; Vadeboncoeur, C. (1997) Replacement of isoleucine-47 by threonine in the HPr protein of *Streptococcus salivarius* abrogates the preferential metabolism of glucose and fructose over lactose and melibiose but does not prevent the phosphorylation of HPr on serine-46. *Mol Microbiol* 25: 695-705.
- Geourjon, C.;** Orelle, C.; Steinfels, E.; Blanchet, C.; Deléage, G.; Di Pietro, A.; Jault, J.M. (2001) A common mechanism for ATP hydrolysis in ABC transporter and helicase superfamilies. *Trends Biochem Sci* 26: 539-44.
- Gilson, E.;** Alloing, G.; Schmidt, T.; Claverys, J.-P.; Dudler, R.; Hofnung, M. (1988) Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in Gram-positive bacteria and in Mycoplasma. *EMBO J* 7: 3971-4.
- Giron-Monzon, L.;** Manelyte, L.; Ahrends, R.; Kirsch, D.; Spengler, B.; Friedhoff, P. (2004) Mapping protein-protein interactions between MutL and MutH by cross-linking. *J Biol Chem* 279: 49338-45.
- Green, M. & Sambrook, J.** (2012) Molecular Cloning: a Laboratory Manual (4th edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Grinkova, Y.V.;** Denisov, I.G.; Sligar, S.G. (2010) Engineering extended membrane scaffold proteins for self-assembly of soluble nanoscale lipid bilayers. *Protein Eng Des Sel* 23: 843-8.
- Grote, M.;** Bordignon, E.; Polyhach, Y.; Jeschke, G.; Steinhoff, H.J.; Schneider, E. (2008) A comparative electron paramagnetic resonance study of the nucleotide-binding domains' catalytic cycle in the assembled maltose ATP-binding cassette importer. *Biophys J* 95: 2924-38.
- Grote, M.;** Polyhach, Y.; Jeschke, G.; Steinhoff, H.J.; Schneider, E.; Bordignon, E. (2009) Transmembrane signaling in the maltose ABC transporter MalFGK<sub>2</sub>-E: periplasmic MalF-P2 loop communicates substrate availability to the ATP-bound MalK dimer. *J Biol Chem* 284: 17521-6.
- Görke, B. & Stülke, J.** (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* 6: 613-24.
- Gösseringer, R.;** Küster, E.; Galinier, A.; Deutscher, J.; Hillen, W. (1997) Cooperative and non-cooperative DNA binding modes of catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium* result from sensing two different signals. *J Mol Biol* 266: 665-76.
- Gottesman, M.M. & Pastan, I.** (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62: 385-427.



- Goudsmits, J.M.H.;** Jan Slotboom, D.; van Oijen, A.M. (2017) Single-molecule visualization of conformational changes and substrate transport in the vitamin B12 ABC importer BtuCD-F. *Nat Commun* 8: 1652.
- Gough, J.A. & Murray, N.E.** (1983) Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J Mol Biol* 166: 1-19.
- Gould, A.D. & Shilton, B.H.** (2010) Studies of the maltose transport system reveal a mechanism for coupling ATP hydrolysis to substrate translocation without direct recognition of substrate. *J Biol Chem* 285: 11290-6.
- Hammes, W.P. & Hertel, C.** (2006) The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *Prokaryotes* 4: 320-403.
- Hansen, P.I.;** Larsen, F.H.; Motawia, S.M.; Blennow, A.; Spraul, M.; Dvortsak, P.; Engelsen, S.B. (2008) Structure and hydration of the amylopectin trisaccharide building blocks—synthesis, NMR, and molecular dynamics. *Biopolymers* 89: 1179-93.
- Henkin, T.M.;** Grundy, F.J.; Nicholson, W.L.; Chambliss, G.H. (1991) Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacI* and *galR* repressors. *Mol Microbiol* 5: 575-84.
- Hermanson, G.T.** (2013) Heterobifunctional crosslinkers. In *Bioconjugate Techniques*, 3rd ed., Amsterdam: Elsevier, pp. 299-339.
- Heuveling, J.;** Frochaux, V.; Ziolkowska, J.; Wawrzinek, R.; Wessig, P.; Herrmann, A.; Schneider, E. (2014) Conformational changes of the bacterial type I ATP-binding cassette importer HisQMP<sub>2</sub> at distinct steps of the catalytic cycle. *Biochim Biophys Acta* 1838: 106-16.
- Higgins, C.F.;** Haag, P.D.; Nikaido, K.; Ardeschir, F.; Garcia, G. und Ames, G.F. (1982) Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*. *Nature* 298: 723-7.
- Higgins, C.F.;** Hiles, I.D.; Salmond, G.P.; Gill, D.R.; Downie, J.A.; Evans, I.J.; Holland, I.B.; Gray, L.; Buckel, S.D.; Bell, A.W.; *et al.* (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* 323: 448-50.
- Higgins, C.F.** (1992) ABC transporters: From microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8: 67-113.
- Higgins, C.F.** (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism-an overview. *Res Microbiol* 152: 205-10.
- Hiratsuka, T.** (1976) Fluorescence Properties of 2'(or 3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl)adenosine 5'-triphosphate and its use in the Study of Binding to heavy meromyosin ATPase. *Biochim Biophys Acta* 453: 293-7.
- Hiratsuka, T.** (1982) Biological activities and spectroscopic properties of chromophoric and fluorescent analogs of adenine nucleoside and nucleotides, 2',3'-O-(2,4,6-trinitrocyclohexadienylidene) adenosine derivatives. *Biochim Biophys Acta* 719: 509-17.
- Hobe, C.** (2016) Identifikation der Interaktionsbereiche zwischen dem Transporter Malf1G1K1<sub>2</sub>-E1 aus *Lactobacillus casei* BL23 und seinem Inhibitor P-Ser-HPr. Masterarbeit, Institut für Biologie der Lebenswissenschaftlichen Fakultät, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Hohl, M.;** Briand, C.; Grütter, M.G.; Seeger, M.A. (2012) Crystal structure of a heterodimeric ABC transporter in its inward-facing conformation. *Nat Struct Mol Biol* 19:395-402.
- Holland, I.B. & Blight, M.A.** (1999) ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* 293: 381-99.

- Hollenstein, K.; Dawson, R.J.; Locher, K.P.** (2007) Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 17: 412-8.
- Homburg, C.** (2010) Biochemische Charakterisierung eines Maltose-/Maltodextrin-ABC-Importers aus *Lactobacillus casei* BL23. Diplomarbeit, Universität Rostock, angefertigt an der Humboldt-Universität zu Berlin.
- Homburg, C.; Bommer, M.; Wuttge, S.; Hobe, C.; Beck, S.; Dobbek, H.; Deutscher, J.; Licht, A.; Schneider, E.** (2017) Inducer exclusion in Firmicutes: insights into the regulation of a carbohydrate ATP binding cassette transporter from *Lactobacillus casei* BL23 by the signal transducing protein P-Ser46-HPr. *Mol Microbiol* 105: 25-45.
- Hsu, W.L.; Furuta, T.; Sakurai, M.** (2017) The mechanism of nucleotide-binding domain dimerization in the intact maltose transporter as studied by all-atom molecular dynamics simulations. *Proteins* doi: 10.1002/prot.25433.
- Hueck, C.J.; Hillen, W.; Saier, M.H., Jr.** (1994) Analysis of a cis-active sequence mediating catabolite repression in gram-positive bacteria. *Res Microbiol* 145: 503-18.
- Hülsmann, A.; Lurz, R.; Scheffel, F.; Schneider, E.** (2000) Maltose and maltodextrin transport in the thermoacidophilic Gram-positive bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius* is mediated by a high-affinity transport system that includes a maltose binding protein tolerant to low pH. *J Bacteriol* 182: 6292-301.
- Hunke, S.; Mourez, M.; Jehanno, M.; Dassa, E.; Schneider, E.** (2000) ATP modulates subunit-subunit interactions in an ATP-binding cassette transporter (MalFGK<sub>2</sub>) determined by site-directed chemical cross-linking. *J Biol Chem* 275: 15526-34.
- Hvorup, R.N.; Goetz, B.A.; Niederer, M.; Hollenstein, K.; Perozo, E.; Locher, K.P.** (2007) Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF. *Science* 317: 1387-90.
- Hyde, S.C.; Emsley, P.; Hartshorn, M.J.; Mimmack, M.M.; Gileadi, U.; Pearce, S.R.; Gallagher, M.P.; Gill, D.R.; Hubbard, R.E.; Higgins, C.F.** (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346: 362-5.
- Imanaka, T. & Kuriki, T.** (1989) Pattern of action of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase on pullulan. *J Bacteriol* 171: 369-74.
- Jansook, P.; Ogawa, N.; Loftsson, T.** (2018) Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 535: 272-84.
- Jones, B. E.; Dossonnet, V.; Küster, E.; Hillen, W.; Deutscher, J.; Klevit, R. E.** (1997) Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *J Biol Chem* 272: 26530-5.
- Jones, P.M.; George, A.M.** (2012) Role of the D-loops in allosteric control of ATP hydrolysis in an ABC transporter. *J Phys Chem A* 116: 3004-13.
- Joyet, P.; Mokhtari, A.; Riboulet-Bisson, E.; Blancato, V.S.; Espariz, M.; Magni, C.; Hartke, A.; Deutscher, J.; Sauvageot, N.** (2017) Enzymes Required for Maltodextrin Catabolism in *Enterococcus faecalis* Exhibit Novel Activities. *Appl Environ Microbiol* 83 pii: e00038-17.
- Kadaba, N.S.; Kaiser, J.T.; Johnson, E.; Lee, A.; Rees, D.C.** (2008) The high-affinity *E. coli* methionine ABC transporter: structure and allosteric regulation. *Science* 321: 250-3.
- Kalckar, H.M.** (1971) The periplasmic galactose binding protein of *Escherichia coli*. *Science* 174: 557-65.

- Kandler, O. & Weiß, N.** (1986) Genus *Lactobacillus*. In: *Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME & Holt JG (Eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2, 9th ed., pp: 1063-5.*
- Kang, J.; Park, J.; Choi, H.; Burla, B.; Kretzschmar, T.; Lee, Y.; Martinoia, E.** (2011) Plant ABC Transporters. *Arabidopsis Book* 9:e0153.
- Karplus, P.A. & Diederichs, K.** (2012) Linking crystallographic model and data quality. *Science* 336: 1030-3.
- Kathawala, R.J.; Gupta, P.; Ashby, C.R. Jr; Chen, Z.S.** (2015) The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug Resist Updat* 18: 1-17.
- Kellermann, O. & Szmelcman, S.** (1974) Active transport of maltose in *E. coli* K12. Involvement of a periplasmic maltose-binding protein. *Eur J Biochem* 47: 139-49.
- Khare, D.; Oldham, M.L.; Orelle, C.; Davidson, A.L.; Chen J.** (2009) Alternating access in maltose transporter mediated by rigid-body rotations. *Mol Cell* 33: 528-36.
- Kilic, A.O.; Honeyman, A.L.; Tao, L.** (2007) Overlapping substrate specificity for sucrose and maltose of two binding protein-dependent sugar uptake systems in *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 266: 218-23.
- Klaenhammer, T.; Altermann, E.; Arigoni, F.; Bolotin, A.; Breidt, F.; Broadbent, J.; Cano, R.; Chaillou, S.; Deutscher, J.; Gasson, M.; van de Guchte, M.; Guzzo, J.; Hartke, A.; Hawkins, T.; Hols, P.; Hutkins, R.; Kleerebezem, M.; Kok, J.; Kuipers, O.; Lubbers, M.; Maguin, E.; McKay, L.; Mills, D.; Nauta, A.; Overbeek, R.; Pel, H.; Pridmore, D.; Saier, M.; van Sinderen, D.; Sorokin, A.; Steele, J.; O'Sullivan, D.; de Vos, W.; Weimer, B.; Zagorec, M.; Siezen, R.** (2002) Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 29-58.
- Kluth, M.; Stindt, J.; Dröge, C.; Linnemann, D.; Kubitz, R.; Schmitt, L.** (2015) A mutation within the extended X loop abolished substrate-induced ATPase activity of the human liver ATP-binding cassette (ABC) transporter MDR3. *J Biol Chem* 290: 4896-907.
- Korkhov, V.M.; Mireku, S.A.; Hvorup, R.N.; Locher, K.P.** (2012) Asymmetric states of vitamin B<sub>12</sub> transporter BtuCD are not discriminated by its cognate substrate binding protein BtuF. *FEBS Lett* 586: 972-6.
- Kühnau, S.; Reyes, M.; Sievertsen, A.; Shuman, H.A.; Boos, W.** (1991) The activities of the *Escherichia coli* MalK protein in maltose transport, regulation, and inducer exclusion can be separated by mutations. *J Bacteriol* 173: 2180-6.
- Kumar, V.** (2010) Analysis of the key active subsites of glycoside hydrolase 13 family members. *Carbohydr Res* 345:893-8.
- Kundig, W.; Gosh, S.; Roseman, S.** (1964) Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phosphotransferase system. *Proc Natl Acad Sci USA* 52: 1067-74.
- Kunová, G.; Rada, V.; Lisová, I.; Ročková, Š.; Vilková, E.** (2011) *In vitro* Fermentability of Prebiotic Oligosaccharides by Lactobacilli. *Czech J Food Sci* 29: 49-54.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Lakowicz, J.R.** (1992) Topics in Fluorescence Spectroscopy, Volume 3: Biochemical Applications, Plenum Press, New York.

- Landete**, J.M.; García-Haro, L.; Blasco, A.; Manzanares, P.; Berbegal, C.; Monedero, V.; Zúñiga, M. (2010) Requirement of the *Lactobacillus casei* MaeKR two-component system for L-malic acid utilization via a malic enzyme pathway. *Appl Environ Microbiol* 76: 84-95.
- Landmesser**, H.; Stein, A.; Blüschke, B.; Brinkmann, M.; Hunke, S.; Schneider, E. (2002) Large-scale purification, dissociation and functional reassembly of the maltose ATP-binding cassette transporter (MalFGK<sub>2</sub>) of *Salmonella typhimurium*. *Biochim Biophys Acta* 1565: 64-72.
- Le Breton**, Y.; Pichereau, V.; Sauvageot, N.; Auffray, Y.; Rincé, A. (2005) Maltose utilization in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Applied Microbiology* 98: 806-13.
- Lee**, Y.H.; Deka, R.K.; Norgard, M.V.; Radolf, J.D.; Hasemann, C.A. (1999) *Treponema pallidum* TroA is a periplasmic zinc-binding protein with a helical backbone. *Nat Struct Biol* 6: 628-33.
- Lee**, H.S.; Kim, M.S.; Cho, H.S.; Kim, J.I.; Kim, T.J.; Choi, J.H.; Park, C.; Lee, H.S.; Oh, B.H.; Park, K.H. (2002) Cyclomaltodextrinase, neopullulanase, and maltogenic amylase are nearly indistinguishable from each other. *J Biol Chem* 277: 21891-7.
- Lengeler**, J.W. (2015) PTS 50: Past, Present and Future, or Diauxie Revisited. *J Mol Microbiol Biotechnol* 25:79-93.
- Leonte**, G. (2011) Untersuchungen zur Regulation des Maltose/Maltodextrin ABC-Importers aus *Lactobacillus casei* BL23. Bachelorarbeit, Institut für Biologie der Lebenswissenschaftlichen Fakultät, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Lewinson**, O.; Lee, A.T.; Locher, K.P.; Rees, D.C. (2010) A distinct mechanism for the ABC transporter BtuCD-BtuF revealed by the dynamics of complex formation. *Nat Struct Mol Biol* 17:332-8.
- Li**, C.H.; Yang, Y.X.; Su, J.G.; Liu, B.; Tan, J.J.; Zhang XY, Wang CX. (2014) Allosteric transitions of the maltose transporter studied by an elastic network model. *Biopolymers* 101: 758-68.
- Lindner**, C.; Galinier, A.; Hecker, M.; Deutscher, J. (1999) Regulation of the activity of the *Bacillus subtilis* antiterminator LicT by multiple PEP-dependent, enzyme I- and HPr-catalysed phosphorylation. *Mol Microbiol* 31: 995-1006.
- Liu**, C. E.; Liu, P.-Q.; Wolf, A.; Lin, E.; Ames, G. F.-L. (1997) Characterization of the adenosin triphosphatase activity of the periplasmic histidine permease, an ABC transporter (traffic ATPase). *J Biol Chem* 272: 21833-91.
- Loo**, T. W. & Clarke, D. M. (2001) Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol crosslinking compounds as molecular rulers. *J Biol Chem* 276: 36877-80.
- Loo**, T.W.; Bartlett, M.C.; Clarke, D.M. (2003) Simultaneous binding of two different drugs in the binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J Biol Chem* 278: 39706-10.
- Lu**, G.; Westbrook, J.M.; Davidson, A.L.; Chen, J. (2005) ATP hydrolysis is required to reset the ATP-binding cassette dimer into the resting-state conformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 17969-74.
- Lu**, C.; Tian, S.; Zhai, G.; Yuan, Z.; Li, Y.; He, X.; Zhang, Y.; Zhang, K. (2017) Probing the Binding Interfaces of Histone-Aptamer by Photo Cross-Linking Mass Spectrometry. *ACS Chem Biol* 12: 57-62.
- Makarova**, K.; Slesarev, A.; Wolf, Y.; Sorokin, A.; Mirkin, B.; Koonin, E.; Pavlov, A.; Pavlova, N.; Karamychev, V.; Polouchine, N.; Shakhova, V.; Grigoriev, I.; Lou, Y.; Rohksar, D.; Lucas, S.; Huang, K.; Goodstein, D.M.; Hawkins, T.; Plengvidhya, V.; Welker, D.; Hughes, J.; Goh, Y.; Benson, A.; Baldwin, K.; Lee, J.H.; Díaz-Muñiz, I.; Dosti, B.; Smeianov, V.; Wechter, W.; Barabote, R.; Lorca, G.; Altermann, E.; Barrangou, R.; Ganesan, B.; Xie, Y.; Rawsthorne, H.; Tamir, D.; Parker, C.; Breidt, F.; Broadbent, J.; Hutkins, R.; O'Sullivan, D.; Steele, J.;

- Unlu, G.; Saier, M.; Klaenhammer, T.; Richardson, P.; Kozyavkin, S.; Weimer, B.; Mills, D. (2006) Comparative genomics of the *Lactic acid bacteria*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 15611-6.
- Manson**, M.D.; Boos, W.; Bassford, P.J. Jr; Rasmussen, B.A. (1985) Dependence of maltose transport and chemotaxis on the amount of maltose-binding protein. *J Biol Chem* 260: 9727-33.
- Maqbool**, A.; Horler, R.S.; Muller, A.; Wilkinson, A.J.; Wilson, K.S.; Thomas, G.H. (2015) The substrate-binding protein in bacterial ABC transporters: dissecting roles in the evolution of substrate specificity. *Biochem Soc Trans* 43: 1011-7.
- Marion**, C.; Aten, A.E.; Woodiga, S.A.; King, S.J. (2011) Identification of an ATPase, MsmK, which energizes multiple carbohydrate ABC transporters in *Streptococcus pneumonia*. *Infect Immun* 79: 4193-200.
- Martineau**, P.; Szmelcman, S.; Spurlino, J.C.; Quiocho, F.A.; Hofnung, M. (1990) Genetic approach to the role of tryptophan residues in the activities and fluorescence of a bacterial periplasmic maltose-binding protein. *J Mol Biol* 214: 337-52.
- Maruyama**, Y.; Itoh, T.; Kaneko, A.; Nishitani, Y.; Mikami, B.; Hashimoto, W.; Murata, K. (2015) Structure of a Bacterial ABC Transporter Involved in the Import of an Acidic Polysaccharide Alginate. *Structure* 23: 1643-54.
- Marvin**, J.S. & Hellinga, H.W. (2001) Manipulation of ligand binding affinity by exploitation of conformational coupling. *Nat Struct Biol* 8: 795-8.
- Matsumoto**, N.; Yamada, M.; Kurakata, Y.; Yoshida, H.; Kamitori, S.; Nishikawa, A.; Tono-zuka, T. (2009) Crystal structures of open and closed forms of cyclo/maltodextrin-binding protein. *FEBS J* 276: 3008-19.
- Maurer**, T.; Meier, S.; Kachel, N.; Munte, C.E.; Hasenbein, S.; Koch, B.; Hengstenberg, W.; Kalbitzer, H.R. (2004) High-resolution structure of the histidine-containing phosphocarrier protein (HPr) from *Staphylococcus aureus* and characterization of its interaction with the bifunctional HPr kinase/phosphorylase. *J Bacteriol* 186: 5906-18.
- Mazé**, A.; Boel, G.; Poncet, S.; Mijakovic, I.; Le Breton, Y.; Benachour, A. (2004) The *Lactobacillus casei* ptsHI47T mutation causes overexpression of a LevR-regulated but RpoN-independent operon encoding a mannose class phosphotransferase system. *J Bacteriol* 186: 4543-55.
- Mazé**, A.; Boël, G.; Zúñiga, M.; Bourand, A.; Loux, V.; Yebra, M.J.; Monedero, V.; Correia, K.; Jacques, N.; Beaufils, S.; Poncet, S.; Joyet, P.; Milohanic, E.; Casarégola, S.; Auffray, Y.; Pérez-Martínez, G.; Gibrat, J.F.; Zagorec, M.; Francke, C.; Hartke, A.; Deutscher, J. (2010) Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *J Bacteriol* 192: 2647-8.
- Miller**, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York*, pp: 466.
- Miller**, D.M., 3<sup>rd</sup>; Olson, J.S.; Pflugrath, J.W.; Quiocho, F.A. (1983) Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis. *J Biol Chem* 258: 13665-72.
- Miller**, S.; Edwards, M.D.; Ozdemir, C.; Booth, I.R. (2003) The closed structure of the MscS mechanosensitive channel: crosslinking of single cysteine mutants. *J Biol Chem* 278: 32246-50.
- Millet**, O.; Hudson, R.P.; Kay, L.E. (2003) The energetic cost of domain reorientation in maltose-binding protein as studied by NMR and fluorescence spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12700-5.
- Mimmack**, M.L.; Gallagher, M.P.; Pearce, S.R.; Hyde, S.C.; Booth, I.R.; Higgins, C.F.; (1989) Energy coupling to periplasmic binding protein-dependent transport systems: stoichiometry of ATP hydrolysis during transport *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8257-61.

- Mokhtari, A.;** Blancato, V.S.; Repizo, G.D.; Henry, C.; Pikis, A.; Bourand, A.; de Fátima Álvarez, M.; Immel, S.; Mechakra-Maza, A.; Hartke, A.; Thompson, J.; Magni, C.; Deutscher, J. (2013) *Enterococcus faecalis* utilizes maltose by connecting two incompatible metabolic routes via a novel maltose 6'-phosphate phosphatase (MapP). *Mol Microbiol* 88: 234-53.
- Moore, J.T.;** Uppal, A.; Maley, F.; Maley, G. F. (1993) Overcoming inclusion body formation in a high level expression system. *Protein Expr Purif* 4: 160-3.
- Monedero, V.;** Kuipers, O.P.; Jamet, E.; Deutscher, J. (2001 a) Regulatory functions of serine-46-phosphorylated HPr in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 183: 3391-8.
- Monedero, V.;** Poncet, S.; Mijakovic, I.; Fieulaine, S.; Dossonnet, V.; Martin-Verstraete, I.; Nessler, S.; Deutscher, J. (2001 b) Mutations lowering the phosphatase activity of HPr kinase/phosphatase switch off carbon metabolism. *EMBO J* 20: 3928-37.
- Monedero, V.;** Mazé, A.; Boël, G.; Zúñiga, M.; Beaufils, S.; Hartke, A.; Deutscher, J. (2007) The phosphotransferase system of *Lactobacillus casei*: regulation of carbon metabolism and connection to cold shock response. *J Mol Microbiol Biotechnol* 12: 20-32.
- Monedero, V.;** Yebra, M.J.; Poncet, S.; Deutscher, J. (2008) Maltose transport in *Lactobacillus casei* and its regulation by inducer exclusion. *Res Microbiol* 159: 94-102.
- Monod, J.** (1942) Recherches sur la Croissance des Cultures Bacteriennes. Thesis, Hermann et Cie, Paris.
- Moussatova, A.;** Kandt, C.; O'Mara, M.L.; Tieleman, D.P. (2008) ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1778: 1757-71.
- Mourez, M.;** Hofnung, M.; Dassa, E. (1997) Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *EMBO J* 16: 3066-77.
- Munoz-Provencio, D. & Monedero, V.** (2011) Shotgun phage display of *Lactobacillus casei* BL23 against collagen and fibronectin. *J Microbiol Biotechnol* 21: 197-203.
- Nakai, H.;** Baumann, M.J.; Petersen, B.O.; Westphal, Y.; Schols, H.; Dilokpimoi, A.; Hachem, M.A.; Lahtinen, S. J.; Duus, J.O.; Svensson, B. (2009) The maltodextrin transport system and metabolism in *Lactobacillus acidophilus* NCFM and production of novel  $\alpha$ -glucosides through reverse phosphorolysis by maltosephosphorylase. *FEBS J* 276: 7353-65.
- Oldham, M.L.;** Khare, D.; Quijcho, F.A.; Davidson, A.L.; Chen, J. (2007) Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. *Nature* 450: 515-21.
- Oldham, M.L.;** Davidson, A.L.; Chen, J. (2008) Structural insights into ABC transporter mechanism. *Curr Opin Struct Biol* 18: 726-33.
- Oldham, M.L. & Chen, J.** (2011 a) Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state. *Science* 332: 1202-5.
- Oldham, M.L. & Chen, J.** (2011 b) Snapshots of the maltose transporter during ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 15152-6.
- Oldham, M.L.;** Chen, S.; Chen, J. (2013) Structural basis for substrate specificity in the *Escherichia coli* maltose transport system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 18132-7.

- Oliveira, A.S.; Baptista, A.M.; Soares, C.M.** (2011) Interdomain communication mechanisms in an ABC importer: a molecular dynamics study of the MalFGK<sub>2</sub>E complex. *PLoS Comput Biol* 7: e1002128.
- Orelle, C.; Ayvaz, T.; Everly, R.M.; Klug, C.S.; Davidson, A.L.** (2008) Both maltose-binding protein and ATP are required for nucleotide-binding domain closure in the intact maltose ABC transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 12837-42.
- Orelle, C.; Alvarez, F.J.; Oldham, M.L.; Orelle, A.; Wiley, T.E.; Chen, J.; Davidson, A.L.** (2010) Dynamics of alpha-helical subdomain rotation in the intact maltose ATP-binding cassette transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20293-8.
- Osumi, T. & Saier, M.H., Jr.** (1982) Regulation of lactose permease activity by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system: evidence for direct binding of the glucose-specific enzyme III to the lactose permease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 1457-61.
- Oswald, C.; Holland, I.B.; Schmitt, L.** (2006) The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us? *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372: 385-99.
- Pajatsch, M.; Gerhart, M.; Peist, R.; Horlacher, R.; Boos, W.; Böck, A.** (1998) The periplasmic cyclodextrin binding protein CymE from *Klebsiella oxytoca* and its role in maltodextrin and cyclodextrin transport. *J Bacteriol* 180: 2630-5.
- Pardee, A.** (1968) Membrane transport proteins. Proteins that appear to be parts of membrane transport systems are being isolated and characterized. *Science* 162: 632-7.
- Park, J.T.; Raychaudhuri, D.; Li, H.; Normark, S.; Mengin-Lecreulx, D.** (1998) MppA, a periplasmic binding protein essential for import of the bacterial cell wall peptide L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate. *J Bacteriol* 180: 1215-23.
- Park, Y.H.; Lee, B.R.; Seok, Y.J.; Peterkofsky, A.** (2006) *In vitro* reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 281: 6448-54.
- Pas, H.H.; Meyer, G.H.; Kruizinga, W.H.; Tamminga, K.S.; van Weeghel, R.P.; Robillard, G.T.** (1991) <sup>31</sup>Phospho-NMR demonstration of phosphocysteine as a catalytic intermediate on the *Escherichia coli* phosphotransferase system EIIMtl. *J Biol Chem* 266: 6690-2.
- Patzlaff, J.S.; van der Heide, T.; Poolman, B.** (2003) The ATP/substrate stoichiometry of the ATP-binding cassette (ABC) transporter OpuA. *J Biol Chem* 278: 29546-51.
- Paull, T.T. & Deshpande, R.A.** (2014) The Mre11/Rad50/Nbs1 complex: recent insights into catalytic activities and ATP-driven conformational changes. *Exp Cell Res* 329: 139-47.
- Pierce, B.G.; Wiehe, K.; Hwang, H.; Kim, B.H.; Vreven, T.; Weng, Z.** (2014) ZDOCK Server: Interactive Docking Prediction of Protein-Protein Complexes and Symmetric Multimers. *Bioinformatics* 30: 1771-3.
- Pletzer, D.; Lafon, C.; Braun, Y.; Köhler, T.; Page, M.G.P.; Mourez, M.; Weingart, H.** (2014) High-throughput screening of dipeptide utilization mediated by the ABC transporter DppBCDF and its substrate-binding proteins DppA1-A5 in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 9: e111311.
- Poncet, S.; Mijakovic, I.; Nessler, S.; Gueguen-Chaignon, V.; Chaptal, V.; Galinier, A.; Boël, G.; Mazé, A.; Deutscher, J.** (2004) HPr kinase/phosphorylase, a Walker motif A-containing bifunctional sensor enzyme controlling catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1697: 123-35.
- Poolman B.** (2002) Transporters and their roles in LAB cell physiology. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 147-64.

- Postma, P.W.;** Epstein, W.; Schuitema, A.R.J.; Nelson, S.O. (1984) Interaction between IIIGlc of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and glycerol kinase of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 158: 351-3.
- Postma, P.W.;** Lengeler, J.W.; Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* 57: 543-94.
- Pridmore, R.D.;** Berger, B.; Desiere, F.; Vilanova, D.; Barretto, C.; Pittet, A.-C.; Zwahlen, M.-C.; Rouvet, M.; Altermann, E.; Barrangou, R.; Mollet, B.; Mercenier, A.; Klaenhammer, T.; Arigoni, F.; Schell, M.A. (2004) The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2512-7.
- Quioco, F.A. &** Ledvina, P.S. (1996) Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol Microbiol* 20: 17-25.
- Quioco, F.A.;** Spurlino, J.C.; Rodseth, L.E. (1997) Extensive features of tight oligosaccharide binding revealed in high-resolution structures of the maltodextrin transport/chemosensory receptor. *Structure* 5: 997-1015.
- Rees, D.C.;** Johnson, E.; Lewinson, O. (2009) ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 218-27.
- Reizer, J.;** Novotny, M.J.; Hengstenberg, W.; Saier, M.H., Jr. (1984) Properties of ATP-dependent protein kinase from *Streptococcus pyogenes* that phosphorylates a seryl residue in HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system. *J Bacteriol* 160: 333-40.
- Ren, Q.;** Chen, K.; Paulsen, I.T. (2007) TransportDB: a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels. *Nucleic Acids Res* 35(Database issue): D274-9.
- Rice, A.J.;** Park, A.; Pinkett, H.W. (2014) Diversity in ABC transporters: type I, II and III importers. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49: 426-37.
- Richarme, G. &** Kepes, A. (1983) Study of binding protein-ligand interaction by ammonium sulfate assisted adsorption on cellulose esters filters. *Biochem Biophys Acta* 742: 16-24.
- Rico, J.;** Yebra, M.J.; Perez-Martinez, G.; Deutscher, J.; Monedero, V. (2008) Analysis of *Idh* genes in *Lactobacillus casei* BL23: role on lactic acid production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 579-86.
- Riordan, J.R.;** Deuchars, K.; Kartner, N.; Alon, N.; Trent, J. und Ling, V. (1985) Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* 316: 817-9.
- Ritchie, T.K.;** Grinkova, Y.V.; Bayburt, T.H.; Denisov, I.G.; Zolnerciks, J.K.; Atkins, W.M.; Sligar, S.G. (2008) Reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs. *Methods Enzymol* 464: 211-32.
- Rodionov, D.A.;** Hebbeln, P.; Eudes, A.; ter Beek, J.; Rodionova, I. A.; Erkens, G. B.; Slotboom, D. J.; Gelfand, M. S.; Osterman, A. L.; Hanson, A. D.; Eitinger, T. (2009) A novel class of modular transporters for vitamins in prokaryotes. *J Bacteriol* 191: 42-51.
- Rodríguez-Díaz, J.;** Rubio-del-Campo, A.; Yebra, M.J. (2012) *Lactobacillus casei* ferments the N-Acetylglucosamine moiety of fucosyl- $\alpha$ -1,3-N-acetylglucosamine and excretes L-fucose. *Appl Environ Microbiol* 78: 4613-9.
- Rogosa, M.;** Wiseman, R. F.; Mitchell, J. A.; Disraely, M. N.; Beaman, A. J. (1953) Species differentiation of oral lactobacilli from man including descriptions of *Lactobacillus salivarius* nov. spec. and *Lactobacillus cellobiosus* nov. spec. *J Bacteriol* 65: 681-99.
- Roth, J.R.** (1970) Genetic techniques in studies of bacterial metabolism. *Methods Enzymol* 17: 3-35.



- Saier, M.H.;** Reddy, V.S.; Tamang, D.G.; Västermark, A. (2014) The transporter classification database. *Nucleic acids research* 42: D251-8.
- Samanta, S.;** Ayvaz, T.; Reyes, M.; Shuman, H.A.; Chen, J.; Davidson, A.L. (2003) Disulfide Cross-linking Reveals a Site of Stable Interaction between C-terminal Regulatory Domains of the Two MalK Subunits in the Maltose Transport Complex. *J Biol Chem* 278: 35265-71.
- Sambrook, J.;** Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual (2<sup>nd</sup> edition), *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.
- Sambrook, J. & Russell, D.W.** (2001) Molecular Cloning: a Laboratory Manual (3<sup>rd</sup> edition), *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA*.
- Sanfelix-Haywood, N.;** Coll-Marques, J.M.; Yebra, M.J. (2011) Role of alphaphosphoglucomutase and phosphoglucose isomerase activities at the branching point between sugar catabolism and anabolism in *Lactobacillus casei*. *J Appl Microbiol* 111: 433-42.
- Saurin, W.;** Köster, W.; Dassa, E. (1994) Bacterial binding protein-dependent permeases: characterization of distinctive signatures for functionally related integral cytoplasmic membrane proteins. *Mol Microbiol* 12: 993-1004.
- Sauvageot, N.;** Mokhtari, A.; Joyet, P.; Budin-Verneuil, A.; Blancato, V.S.; Repizo, G.D.; Henry, C.; Pikis, A.; Thompson, J.; Magni, C.; Hartke, A.; Deutscher, J. (2017) *Enterococcus faecalis* uses a PTS permease and a host colonization-related ABC transporter for maltodextrin uptake. *J Bacteriol* 199: e00878-16.
- Schäfer, K.;** Magnusson, U.; Scheffel, F.; Schiefner, A.; Sandgren, M.O.; Diederichs, K.; Welte, W.; Hülsmann, A.; Schneider, E.; Mowbray, S.L. (2004) X-ray structures of the maltose-maltodextrin-binding protein of the thermoacidophilic bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius* provide insight into acid stability of proteins. *J Mol Biol* 335: 261-74.
- Scheepers, G.H.;** A Nijeholt, J.A.L.; Poolman, B. (2016) An updated structural classification of substrate binding proteins. *FEBS Lett* 590: 4393-401.
- Scheffel, F.;** Fleischer, R.; Schneider, E. (2004) Functional reconstitution of a maltose ATP-binding cassette transporter from the thermoacidophilic Gram-positive bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Biochim Biophys Acta* 1656: 57-65.
- Schlösser, A.;** Kampers, T.; Schrempf, H. (1997) The Streptomyces ATP binding component MsiK assists in cellobiose and maltose transport. *J Bacteriol* 179: 2092-5.
- Schönert, S.;** Seitz, S.; Krafft, H.; Feuerbaum, E.-A.; Andernach, I.; Witz, G.; Dahl, M.K. (2001) Maltose and maltodextrin utilization by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188: 3911-22.
- Schumacher, M.A.;** Allen, G.S.; Diel, M.; Seidel, G.; Hillen, W.; Brennan, R.G. (2004) Structural basis for allosteric control of the transcription regulator CcpA by the phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell* 118: 731-41.
- Sharff, A.J.;** Rodseth, L.E.; Spurlino, J.C.; Quijcho, F.A. (1992) Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry* 31: 10657-63.
- Sharff, A.J.;** Rodseth, L.E.; Quijcho, F.A. (1993) Refined 1.8-Å structure reveals the mode of binding of  $\beta$ -cyclodextrin to the maltodextrin binding protein. *Biochemistry* 32: 10553-9.

- Shilton, B.H.**; Flocco, M.M.; Nilson, M.; Mowbray, S.-L. (1996) Conformational changes of three periplasmic receptors for bacterial chemotaxis and transport: the maltose-, glucose/galactose and ribose binding proteins. *J Mol Biol* 264: 350-63.
- Shilton, B.H.** (2007) The dynamics of the MBP-MalFGK<sub>2</sub> interaction: a prototype for binding protein dependent ABC-transporter systems. *Biochim Biophys Acta* 1778: 1772-80.
- Sinz, A.** (2006) Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass Spectrom Rev* 25: 663-82.
- Smith, P.C.**; Karpowich, N.; Millen, L.; Moody, J.E.; Rosen, J.; Thomas, P.J.; Hunt, J.F. (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* 10: 139-49.
- Sondej, M.**; Weinglass, A.B.; Peterkofsky, A.; Kaback, H.R. (2002) Binding of enzyme IIA<sup>Glc</sup>, a component of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system, to the *Escherichia coli* lactose permease. *Biochemistry* 41: 5556-65.
- Stam, M.R.**; Danchin, E.G.; Rancurel, C.; Coutinho, P.M.; Henrissat, B. (2006) Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of alpha-amylase-related proteins. *Protein Eng Des Sel* 19:555-62.
- Stülke, J.**; Arnaud, M.; Rapoport, G.; Martin-Verstraete, I. (1998) PRD-a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. *Mol Microbiol* 28: 865-74.
- Stülke, J.** & Hillen, W. (1999) Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2: 195-201.
- Stülke, J.** & Hillen, W. (2000) Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol* 54: 849-80.
- Sutcliffe, I.C.** & Russell, R.R. (1995) Lipoproteins of grampositive bacteria. *J Bacteriol* 177: 1123-28.
- Szöllősi, D.**; Rose-Sperling, D.; Hellmich, U.A.; Stockner, T. (2017) Comparison of mechanistic transport cycle models of ABC exporters. *Biochim Biophys Acta pii*: S0005-2736(17)30346-2.
- Tarling, E.J.**; de Aguiar Vallim, T.Q.; Edwards, P.A. (2013) Role of ABC transporters in lipid transport and human disease. *Trends Endocrinol Metab* 24: 342-50.
- Tartof, K.D.** & Hobbs, C.A. (1988) New Cloning vectors and techniques for easy and rapid restriction mapping. *Gene* 67: 169-82.
- ter Beek, J.**; Guskov, A.; Slotboom, D.J. (2014) Structural diversity of ABC transporters. *J Gen Physiol* 143: 419-35.
- Theodoulou, F.L.** & Kerr, I.D. (2015) ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochem Soc Trans* 43: 1033-40.
- Thomas, G.H.** (2010) Homes for the orphans: utilization of multiple substrate-binding proteins by ABC transporters. *Mol Microbiol* 75: 6-9.
- Thomson, J.**; Liu, Y.; Sturtevant, J.M.; Quiocho, F.A. (1998) A thermodynamic study of the binding of linear and cyclic oligosaccharides to the maltodextrin-binding protein of *Escherichia coli*. *Biophys Chem* 70: 101-8.
- Titgemeyer, F.** & Hillen, W. (2002) Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 59-71.

- Toh, H.;** Oshima, K.; Nakano, A.; Takahata, M.; Murakami, M.; Takaki, T.; Nishiyama, H.; Igimi, S.; Hattori, M.; Morita, H. (2013) Genomic adaptation of the *Lactobacillus casei* group. *PLoS ONE* 8: e75073.
- Tonkova, A.** (1998) Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microb Technol* 22: 678-86.
- Tonozuka, T.;** Sogawa, A.; Yamada, M.; Matsumoto, N.; Yoshida, H.; Kamitori, S.; Ichikawa, K.; Mizuno, M.; Nishikawa, A.; Sakano, Y. (2007) Structural basis for cyclodextrin recognition by *Thermoactinomyces vulgaris* cyclo/maltodextrin-binding protein. *FEBS J* 274: 2109-20.
- Tortosa, P.;** Aymerich, S.; Lindner, C.; Saier, M.H., Jr; Reizer, J.; Le Coq, D. (1997) Multiple phosphorylation of SacY, a *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator negatively controlled by the phosphotransferase system. *J Biol Chem* 272: 17230-7.
- Towbin, H.;** Staehelin, T.; Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4.
- Tschapek, B.;** Pittelkow, M.; Sohn-Bösser, L.; Holtmann, G.; Smits, S.H.J.; Gohlke, H.; Bremer, E.; Schmitt, L. (2011) Arg149 is involved in switching the low affinity, open state of the binding protein AfProX into its high affinity, closed state. *J Mol Biol* 411: 36-52.
- Vadeboncoeur, C.;** Brochu, D.; Reizer, J. (1991) Quantitative determination of the intracellular concentration of the various forms of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system in growing cells of oral streptococci. *Anal Biochem* 196: 24-30.
- Vasiliou, V.;** Vasiliou, K.; Nebert, D.W. (2009) Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics* 3: 281-90.
- Veit, G.;** Avramescu, R.G.; Chiang, A.N.; Houck, S.A.; Cai, Z.; Peters, K.W.; Hong, J.S.; Pollard, H.B.; Guggino, W.B.; Balch, W.E.; Skach, W.R.; Cutting, G.R.; Frizzell, R.A.; Sheppard, D.N.; Cyr, D.M.; Sorscher, E.J.; Brodsky, J.L.; Lukacs, G.L. (2016) From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell* 27: 424-33.
- Velázquez-Campoy, A.;** Ohtaka, H.; Nezami, A.; Muzammil, S.; Freire, E. (2004) Isothermal titration calorimetry. *Curr. Protoc. Cell Biol* 23: 17.8.1-24.
- Vetter, I.R. & Wittinghofer, A.** (1999) Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer. *Q Rev Biophys* 32: 1-56.
- Viana, R.;** Monedero, V.; Dossonnet, V.; Vadeboncoeur, C.; Pérez-Martínez, G.; Deutscher, J. (2000) Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Mol Microbio* 36: 570-84.
- Walker, J.E.;** Saraste, M.; Runswick, M. J. und Gay, N. J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* 1: 945-51.
- Weiss, J.N.** (1997) The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J* 11: 835-41.
- Weiss, M.S.** (2001) Global indicators of X-ray data quality. *J Appl Cryst* 34: 130-5.
- Wen, P.C. & Tajkhorshid, E.** (2011) Conformational coupling of the nucleotide-binding and the transmembrane domains in ABC transporters. *Biophys J* 101: 680-90.
- Weng, J.;** Gu, S.; Gao, X.; Huang, X.; Wang, W. (2017) Maltose-binding protein effectively stabilizes the partially closed conformation of the ATP-binding cassette transporter MalFGK<sub>2</sub>. *Phys Chem Chem Phys* 19: 9366-73.

- Wietelmann, T.** (2018) Untersuchungen zur Substratspezifität von drei Substratbindeproteinen aus *Lactobacillus casei* BL23. Bachelorarbeit, Institut für Biologie der Lebenswissenschaftlichen Fakultät, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Wiseman, T.;** Williston, S.; Brandts, J.F.; Lin, L.N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* 179: 131-7.
- Wuttge, S.;** Licht, A.; Timachi, M.H.; Bordignon, E.; Schneider, E. (2016) Mode of Interaction of the Signal-Transducing Protein EIIA<sup>Glc</sup> with the Maltose ABC Transporter in the Process of Inducer Exclusion. *Biochemistry* 55: 5442-52.
- Xiong, J.;** Feng, J.; Yuan, D.; Zhou, J.; Miao, W. (2015) Tracing the structural evolution of eukaryotic ATP binding cassette transporter superfamily. *Sci Rep* 5: 16724.
- Yang, J.;** Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J.; Zhang, Y. (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 12:7-8.
- Ye, J.J.;** Reizer, J.; Cui, X.; Saier, Jr., M.H. (1994) ATP-dependent phosphorylation of serine in HPr regulates lactose: H<sup>+</sup> symport in *Lactobacillus brevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3102-3106.
- Yebra, M.J.;** Monedero, V.; Zúñiga, M.; Deutscher, J.; Pérez-Martínez, G. (2006) Molecular analysis of the glucose-specific phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system from *Lactobacillus casei* and its links with the control of sugar metabolism. *Microbiology* 152: 95-104.
- Zaitseva, J.;** Jenewein, S.; Jumpertz, T.; Holland, I.B.; Schmitt, L. (2005) H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *EMBO J* 24: 1901-10.

## Abkürzungsverzeichnis

<i>A. bidest</i>	<i>Aqua bidest</i>
ABC	ATP-binding cassette
ADP	Adenosindiphosphat
AMP-PNP	Adenylyl-imidodiphosphat
Ap <sup>R</sup>	Ampicillin Resistent
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure ( <i>Bicinchonic acid</i> )
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
Bio	Biotin
bp	Basenpaare
BPM	Benzophenon-4-Maleimid
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CCR	<i>carbon catabolite repression</i>
CD	C-terminale Domäne
Cm <sup>R</sup>	Chloramphenicol Resistenz
CGTase	Cyclodextringlykosyltransferase
CuPhe	Kupferphenanthrolin
Da	Dalton
DDM	<i>n</i> -Dodecyl-β-D-Maltosid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EI	Enzym I
EIIA	Enzym IIA
EBS	1,2-Ethandiyl-Bismethanthiosulfonat
ECF	<i>Energy coupling factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	Elektronenspinresonanz
fw	<i>forward</i>
x <i>g</i>	x Erdbeschleunigung
Glc	Glucose
HBS	1,6-Hexandiyl-Bismethanthiosulfonat
HPr	<i>Histidine-containing oder heat-stable protein</i> (Schreibweise basierend auf Kundig <i>et al.</i> ; 1964)
HprK/P	HPr Kinase/Phosphorylase (Schreibweise basierend auf Deutscher <i>et al.</i> , 2014)
HSP	<i>high speed pellet</i>
ICL	Intrazelluläre Kopplungshelix
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
kb	Kilobasen
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante

kDa	Kilodalton
LAB	<i>lactic acid bacteria</i>
LacI	Inhibitor des Lac-Operons
LB	<i>lysogeny broth</i>
LSP	<i>low speed pellet</i>
MBB	MTS-BP-Bio
MDR	<i>Multidrug resistance protein</i>
MIANS	2-(4'-Maleimidylanilino)-Naphthalen-6-Sulfonsäure
MBP	Maltosebindeprotein
MSP	Gürtelprotein ( <i>membrane scaffold protein</i> )
MTS-BP-Bio	2-[N <sup>α</sup> -Benzoylbenzoicamido-N <sup>6</sup> -(6-biotinamidocaproyl)-L-lysinylamido]ethyl Methanethiosulfonat
MTSSL	(-)-(1-Oxyl-2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidin-3-yl)methyl Methanethiosulfonat
N-	Amino-
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NB	<i>nutrient broth</i>
NBD	Nukleotidbindedomäne
NBS	Nukleotidbindestelle
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalm
NEM	N-Ethylmaleimid
NMM	N-Methylmaleimid
NTA	Nitrilotriessigsäure ( <i>nitrilo triacetic acid</i> )
OD	Optische Dichte
OG	Octyl β-D-Glucopyranosid
P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat
PP <sub>i</sub>	Anorganisches Pyrophosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophoreses
PBP	Periplasmatisches Bindeprotein
PBS	3,6,9,12,15-Pentaoxaheptadecan-1,17-diyl-Bismethanthiosulfonat
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDB	Proteindatenbank
PEP	Phosphoenolpyruvat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P-gp	<i>permeability glycoprotein</i>
Pst	Proteinstandard
PTS	PEP-abhängiges Phosphotransferasesystem
RD	Regulatorische Domäne
RT	Raumtemperatur
rv	<i>reverse</i>
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SBP	Substratbindeprotein ( <i>soluble binding protein</i> )
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TB	<i>terrific broth</i>
TCA	Trichloressigsäure ( <i>trichloroacetic acid</i> )
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-Diamin
TM	Transmembran
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TNT	Tris-NaCl-Tween

UV	Ultraviolettes Licht
UZ	Ultrazentrifuge
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>

## Anhang

### Tabellen

**Tabelle 9: Datensammlung und Verfeinerungsstatistik für experimentell ermittelte dreidimensionale Strukturen in Ab- oder Anwesenheit linearer Maltodextrine.** Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösung. R-meas: Redundancy-independent merging R-factor (Diederichs & Karplus, 1997). R-pim: Precision-indicating merging R-factor (Weiss, 2001).CC<sub>1/2</sub>: Pearson correlation coefficient of half data sets (Karplus & Diederichs, 2012)

	SAD	Maltotetraose	Maltotriose	no ligand
<b>Data Collection</b>				
Beamline	BESSY II 14.1	BESSY II 14.1	BESSY II 14.1	BESSY II 14.1
Wavelength (Å)	1.900	0.9184	0.9184	0.9184
Resolution range (Å)	45.3 – 2.40 (2.48 – 2.40)	33.3 - 1.12 (1.16 - 1.12)	24.6 - 1.08 (1.12 - 1.08)	46.2 - 1.70 (1.76 - 1.70)
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 1 (h, -k, -l twin)
Unit cell (Å)	53.54 82.70 84.85 90° 90° 90°	53.49 83.08 85.04 90° 90° 90°	54.27 82.65 84.93 90° 90° 90°	41.04 124.95 143.74 74.51° 89.61° 89.86°
Total reflections	467111 (40655)	1830249 (165257)	2508353 (161379)	1033081 (98099)
Unique reflections	15330 (1494)	146247 (14239)	155553 (12075)	294468 (28329)
Multiplicity	30.5 (27.2)	12.5 (11.6)	16.1 (13.4)	3.5 (3.5)
Completeness	0.99 (0.99)	1.00 (0.98)	0.95 (0.74)	0.97 (0.93)
Mean I/sigma(I)	68.7 (31.0)	23.5 (2.00)	25.3 (2.5)	13.2 (1.9)
Wilson B-factor (Å <sup>2</sup> )	14.9	12.1	8.58	15.4
R-merge	0.047 (0.095)	0.055 (1.218)	0.073 (1.103)	0.068 (0.607)
R-meas	0.048 (0.097)	0.057 (1.274)	0.076 (1.146)	0.080 (0.720)
R-pim	0.009 (0.018)	0.016 (0.386)	0.019 (0.304)	0.042 (0.382)
CC <sub>1/2</sub>	1 (0.999)	1 (0.749)	1 (0.783)	0.999 (0.663)
<b>Refinement</b>				
R-work		0.120 (0.208)	0.128 (0.211)	0.178 (0.268)
R-free		0.137 (0.223)	0.141 (0.225)	0.218 (0.306)
Number of non-H atoms		3528	3658	24739
Macromolecules		2929	2865	22424
Ligands		141	36	-
Solvent		456	517	2315
Protein residues		373	372	2984
RMS(bonds, Å)		0.009	0.006	0.003
RMS(angles, °)		1.08	0.92	0.8
Ramachandran favored (%)		99	99	98
Ramachandran outliers (%)		0	0	0.17
Rotamer outliers (%)		0.96	0.33	0.33
Clashscore		4.4	3.1	8.3
Average B-factor (Å <sup>2</sup> )		18.9	15.0	24.9
Macromolecules		17.0	11.8	24.9
Ligands		20.0	8.0	-
Solvent		30.9	27.3	25.5



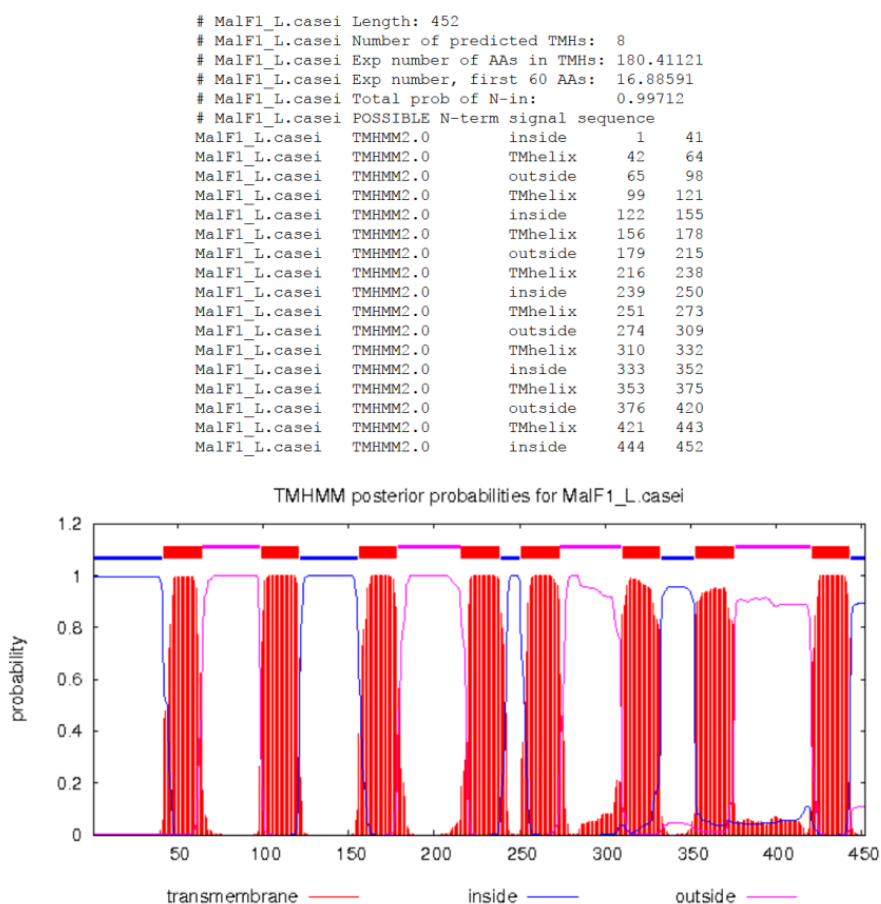
**Tabelle 10: Datensammlung und Verfeinerungsstatistik für experimentell ermittelte dreidimensionale Strukturen in Anwesenheit zyklischer Maltodextrine.** Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösung. R-meas: Redundancy-independent merging R-factor (Diederichs & Karplus, 1997). R-pim: Precision-indicating merging R-factor (Weiss, 2001).CC<sub>1/2</sub>: Pearson correlation coefficient of half data sets (Karplus & Diederichs, 2012)

	$\alpha$ -Cyclodextrin	$\beta$ -Cyclodextrin	$\gamma$ -Cyclodextrin
<b>Data Collection</b>			
Beamline	BESSY II 14.2	BESSY II 14.1	BESSY II 14.2
Wavelength (Å)	0.9184	0.8856	0.9184
Resolution range (Å)	19.3 - 1.00 (1.04 - 1.00)	24.6 - 0.92 (0.95 - 0.92)	41.3 - 1.15 (1.19 - 1.15)
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Unit cell (Å)	54.32 82.39 85.25 90° 90° 90°	52.14 74.90 90.09 90° 90° 90°	54.62 82.60 84.85 90° 90° 90°
Total reflections	2283757 (138125)	2975163 (242825)	1770091 (167259)
Unique reflections	203852 (19654)	231987 (21195)	131539 (12561)
Multiplicity	11.2 (7.0)	12.8 (11.5)	13.5 (13.3)
Completeness	0.99 (0.96)	0.95 (0.88)	0.96 (0.93)
Mean I/sigma(I)	16.8 (2.0)	23.1 (2.1)	21.9 (2.0)
Wilson B-factor (Å <sup>2</sup> )	9.65	6.84	10.46
R-merge	0.071 (0.933)	0.067 (1.136)	0.087 (1.261)
R-meas	0.074 (1.007)	0.069 (1.189)	0.090 (1.311)
R-pim	0.021 (0.373)	0.019 (0.344)	0.024 (0.355)
CC <sub>1/2</sub>	1 (0.787)	1 (0.675)	1 (0.715)
<b>Refinement</b>			
R-work	0.123 (0.206)	0.109 (0.210)	0.125 (0.205)
R-free	0.143 (0.221)	0.122 (0.230)	0.146 (0.221)
Number of non-H atoms	3791	3962	3656
Macromolecules	2912	3112	2875
Ligands	132	80	88
Protein residues	372	378	372
RMS(bonds, Å)	0.008	0.008	0.009
RMS(angles, °)	1.05	1.22	1.16
Ramachandran favored (%)	99	99	99
Ramachandran outliers (%)	0	0	0
Rotamer outliers (%)	0.32	0.3	0
Clashscore	1.0	3.7	1.5
Average B-factor (Å <sup>2</sup> )	14.0	11.4	16.7
Macromolecules	11.1	8.7	13.7
Ligands	11.2	9.4	13.8
Solvent	26.0	22.7	29.3

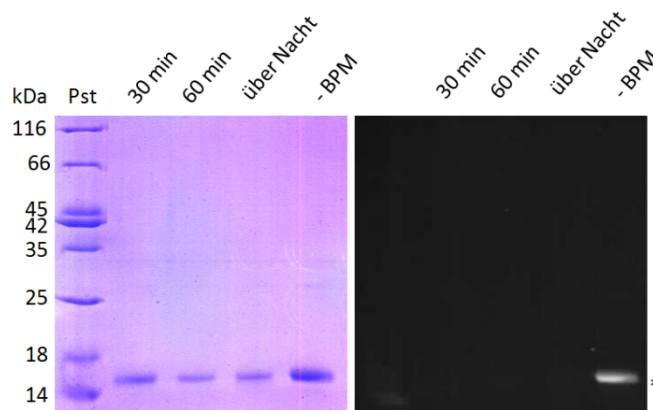
**Tabelle 11: Über MALDI-Orbitrap Messungen detektierte Peptide von Trypsinverdauten Quervernetzungsprodukten.**

Protein	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Position	Sequenz	Spektrum P- Ser46- HPr(T20C- BPM)	Spektrum MalK1	Spektrum Querver- netzungs- bande
<b>MalK1</b>	3035,46	102-127	NIAMVFQNYALYPHMTVFDNMAFGLK		+	+
	2577,34	230-252	VVMSVGQIQIGTPAEIYEYPR		+	+
	2427,12	209-229	LETTTIYVTHDQTEAMTMAD R		+	+
	2381,14	253-273	NQFVAGFIGSPAMNFFDVTY R		+	+
	2213,00	1-18	HHHHHHHHHSSGHIEGR			
	2102,97	19-35	HMMDDVMVEIDLNLHYK			
	1893,84	362-378	DFHSPGDTVNMGFDLNK		+	+
	1888,94	177-193	DAPIFLMDEPLSNLDAK		+	+
	1768,87	84-99	GTLMDHQVMNDVAPK		+	+
	1630,92	140-155	VAAAADILGLTEFLAR		+	+
	1536,74	379-391	AHFFDKESTDAIR		+	+
	1476,77	349-361	IDETEFVAIVNAR		+	+
	1339,67	56-68	EFIVFGPSGCGK		+	
	1312,71	156-167	KPADLSGGQRQR		+	+
	1140,57	37-46	YPNAAQYSVK		+	+
	1122,54	294-303	VLEDQGYNGK			
	1062,55	74-83	MVAGLEDISK		+	+
	1028,55	156-165	KPADLSGGQR		+	+
	887,46	47-53	DFDLHIK		+	+
	791,39	385-391	ESTDAIR			+
	790,39	274-281	DGVISDGK			
	764,37	379-384	AHFFDK		+	+
	757,42	285-291	LSVPEGR		+	+
	731,37	134-139	DAIQR		+	+
	577,33	69-73	STTLR			
	553,32	205-208	LHQR		+	+
	547,25	392-396	ADADR			
	531,31	200-204	AEIAK			
	515,33	168-172	VALGR		+	+
<b>MalF1</b>	1325,70	5-15	KNHLPPEATYR			+
	1251,65	345-355	IDGANAFQIFR		+	+
<b>P-Ser46-HPr (T20C-BPM)</b>	3595,72	65-101	SIMGVMSLGVGQGADVTISAEGADEADAIAAITD TMK			
	2552,37	24-47	EFNIIAETGIHARPACLLVQAASK			
	1768,85	2-17	GSSHHHHHHSSGLVPR	+		+
	1477,77	24-36	EFNLLAETGIHAR	+		+
	1242,60	48-57	FNSDINLEYK	+		+
	560,34	60-64	SVNLK	+		
	551,25	18-22	GSMEK			
	518,25	103-107	EGLAE	+		

## Abbildungen



**Abbildung 33: Topologiemodell von MalF1 aus *L. casei* BL23.** Mittels TMHMM Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) wurde ein Topologiemodell von MalF1 erstellt. MalF1 setzt sich demnach aus 8 TM-Helices, 4 extracytoplasmatischen und 4 cytosolischen Helices zusammen. Die zweite extracytoplasmatische Schleife hat eine Länge von 36 Aminosäuren.

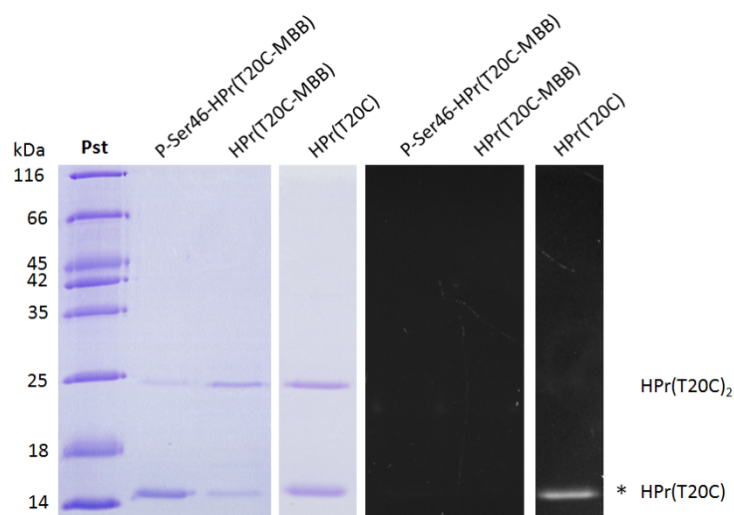


**Abbildung 34: Überprüfung der Effizienz der BPM-Markierung von P-Ser46-HPr(T20C) über anschließende Markierung mit dem Fluorophor MIANS.** 300  $\mu$ M P-Ser46-HPr(T20C) wurde mit 3 mM BPM für 30 Minuten, 60 Minuten oder über Nacht markiert. Unter Rotlicht wurde die Reaktion gestoppt und der Ansatz zur Entfernung von überschüssigem BPM entsalzen. Aliquots wurden mit 20  $\mu$ M MIANS für 15 Minuten auf Eis inkubiert und auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen. Unbehandeltes P-Ser46-HPr(T20C) (\*) diente als Kontrolle. MIANS markiertes P-Ser46-HPr(T20C) wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht (rechts) und das SDS-Gel anschließend über Coomassie gefärbt (links). Bereits nach 30 Minuten BPM Markierung war der Inhibitor vollständig markiert.

```
>MalK1_L. casei BL23
HHHHHHHHSSGHIEGRHMMDDVMVEIDLNHLYKKYPNAAQYSVKDFDLHIKNKEFIVFVGPSGCGKSTTLRM
VAGLEDISKGTLMDHQVMNDVAPKDRNIAMVFQNYALPHMTVFDNMAFGLKLRKYSKDAIQERVAAAADIIG
LTFELARKPADLSGGQRQRVALGRAIVRDAPIFLMDEPLSNLDAKLRVSMRAEIAKLHQRLETTTIYVTHDQTEAMT
MADRVVVMSVGQIQIGTPAEIYEYPRNQFVAGFIGSPAMNFFDVTYRDGVISDGKGLRLSVPEGRAKVLEDQGY
NGKQLVFGIRPEDIHSEEAFLWTWPEAVIASQVVVSELLGATSQLYQKIDETEFVAIVNARDFHSPGDTV
NMGFDLNKAHFFDKESTDAIRADADRTVKV

>HPr(T20C)_L. casei BL23
MGSSHHHHHSSGLVPRGSMKEKREFNIAETGIHARPALLVQAASKFNSDINLEYKGKSVNLKSIMGVMSLGVGQ
GADVTISAEGADEADAIAAITDTMKKEGLAE
```

**Abbildung 35: Identifizierung der über CuPhe quervernetzten Proteine.** Die Quervernetzungsbande aus Abbildung 23 wurde mit Trypsin verdaut und einer Massenspektrometrie unterzogen. Die gelb hervorgehobenen Sequenzabschnitte wurden in der Quervernetzungsbande identifiziert und bestätigten die Anwesenheit von MalK1(Cys46) und HPr(T20C) in der Bande.



**Abbildung 36: Überprüfung der Effizienz der MBB-Markierung von P-Ser46-HPr(T20C) und HPr(T20C) über anschließende Markierung mit dem Fluorophor MIANS.** 300  $\mu$ M P-Ser46-HPr(T20C) bzw. HPr(T20C) wurden für 30 Minuten im Dunkeln mit 3 mM MBB markiert. Unter Rotlicht wurde die Reaktion gestoppt und der Ansatz zur Entfernung von überschüssigem MBB entsalzen. 20  $\mu$ M markiertes Protein wurde mit 20  $\mu$ M MIANS für 15 Minuten auf Eis inkubiert und auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen. Unbehandeltes HPr(T20C) (\*) diente als Kontrolle. MIANS markiertes Protein wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht (rechts) und das SDS-Gel anschließend über Coomassie gefärbt (links). Die fehlende Fluoreszenz der MTS-BP-Bio markierten Proteine sprach für eine erfolgreiche Markierung. MBB, MTS-BP-Bio

[illegible]

**Abbildung 38: Aminosäuresequenzvergleich von MalF1 mit *E. coli* MalF.** Die in MalF identifizierten

## Publikation

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

**Homburg, C.\*; Bommer, M.\*; Wuttge, S.; Hobe, C.; Beck, S.; Dobbek, H.; Deutscher, J.; Licht, A.; Schneider, E. (2017)** Inducer exclusion in Firmicutes: insights into the regulation of a carbohydrate ATP binding cassette transporter from *Lactobacillus casei* BL23 by the signal transducing protein P-Ser46-HPr. *Mol Microbiol* 105: 25-45. doi: 10.1111/mmi.13680.

\* geteilte Erstautorenschaft



## Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person. Deshalb möchte ich mich im folgenden Abschnitt bei allen Menschen bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht und mich während der vielen Jahre tatkräftig unterstützt haben.

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Erwin Schneider. Vielen Dank für die tatkräftige Unterstützung und die exzellente fachliche Betreuung.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Thomas Eitinger für die bereitwillige Übernahme eines Gutachtens und für interessante Diskussionen innerhalb der Seminare.

Herrn Prof. Dr. Josef Deutscher und seinen Mitarbeitern möchte ich für die hervorragenden vorangehenden Arbeiten in Bezug auf die Regulation in Gram-positiven Bakterien danken. Zusätzlich bedanke ich mich für die Erstellung eines Gutachtens.

Bei Dr. Martin Bommer und Prof. Dr. Holger Dobbek (Strukturbiologie/Biochemie, HU Berlin) bedanke ich mich für die freundliche und erfolgreiche Zusammenarbeit bei den MalE1-Kristallisationsexperimenten.

Außerdem geht ein Dank an Prof. Dr. Oliver Daumke (Struktur und Membraninteraktionen von G-Proteinen, MDC Berlin-Buch), in dessen Arbeitsgruppe ich die ITC-Messungen durchführen konnte.

Bei Gabriele Brune und Heidi Landmesser sowie allen anderen Labormitarbeitern bedanke ich mich für die unermüdliche Unterstützung im Laboralltag. Ich danke außerdem Steven Wuttge, Carolin Hobe, Georgeta Leonte und Theresa Wietelmann, die einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Anke Licht bedanken. Als meine Betreuerin und Freundin stand sie mir mit ihrem umfangreichen Wissen, ihrer mühevollen Geduld und ihrem liebevollen Verständnis all die Jahre unterstützend zur Seite. Nach meinen Elternzeiten habe ich dank ihr schnell wieder in den Laboralltag gefunden. Weiterhin haben mir Ihre kritischen Betrachtungen, differenzierten Anmerkungen sowie zahlreiche Diskussionen Kraft und Mut zur Vollendung meiner Dissertation gegeben.

Schließlich möchte ich mich bei meiner gesamten Familie bedanken. Ohne Eure Unterstützung wäre das nie möglich gewesen. DANKE!

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Berlin, den .....2018

.....  
Constanze Homburg